

DANIELA BLECKER

---

Das neuronale Differenzierungspotenzial  
von caninen mesenchymalen Stammzellen  
aus dem Fettgewebe



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines  
**Dr. biol. anim.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2016

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1<sup>st</sup> Edition 2016

© 2016 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie der  
Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Herr Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold

# **Das neuronale Differenzierungspotenzial von caninen mesenchymalen Stammzellen aus dem Fettgewebe**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. biol. anim.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

**Daniela Blecker**

M.Sc. Biologin aus Offenbach am Main

Gießen 2016

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität  
Gießen

Dekan: Herr Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold  
Prof. Dr. Martin Schmidt

Tag der Disputation: 24.10.2016



MEINEM VATER

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	II
Tabellenverzeichnis.....	III
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1. Einleitung .....	1
2. Literaturübersicht.....	3
2.1 Stammzellen .....	3
2.1.1 Mesenchymale Stammzellen.....	4
2.1.2 Kriterien für MSCs in <i>in vitro</i> Studien .....	5
2.1.3 Differenzierung von Stammzellen <i>in vitro</i> .....	5
2.1.3.1 Osteogene Differenzierung von Stammzellen .....	6
2.1.3.2 Adipogene Differenzierung von Stammzellen.....	6
2.1.3.3 Chondrogene Differenzierung von Stammzellen .....	6
2.1.4 Neurale Stammzellen .....	7
2.1.5 Neurogenese .....	8
2.1.5.1 Embryonale Neurogenese.....	8
2.1.5.2 Postnatale und adulte Neurogenese .....	9
2.1.6 Neurotrophine .....	11
2.1.6.1 Nerve growth factor (NGF).....	12
2.1.6.2 Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) .....	13
2.1.6.3 Glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF).....	14
2.1.7 Neuronale und gliale Markergene .....	14
2.1.7.1 Glial fibrillary acidic protein (GFAP).....	15
2.1.7.2 Microtubule associated protein 2 (MAP2).....	15
2.1.7.3 Nestin.....	16
2.1.7.4 Neuron-specific class III beta-tubulin ( $\beta$ -III-Tubulin) .....	17
2.2 Mesenchymale Stammzellen aus dem Fettgewebe.....	18
2.2.1 Canine mesenchymale Stammzellen aus dem Fettgewebe .....	19
2.3 Therapeutische Anwendungsmöglichkeiten von Stammzellen in der Medizin .....	20

2.3.1	Therapeutische Anwendung von caninen MSCs in der Medizin .....	21
2.3.2	Einsatz von Stammzellen bei neurologischen Erkrankungen.....	22
2.3.3	Einsatz von neuronalen Stammzellen .....	23
2.3.4	Einsatz von mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark und Fettgewebe zur neuronalen Differenzierung .....	23
2.4	Neuronale Differenzierung mesenchymaler Stammzellen .....	24
2.4.1	Neuronale Differenzierung caniner mesenchymaler Stammzellen .....	25
3.	Material und Methoden.....	26
3.1	Material .....	26
3.1.1	Verwendete Chemikalien und Reagenzien für die Zellkultur.....	26
3.1.2	Verwendete Chemikalien und Reagenzien für histologische Färbungen .....	27
3.1.3	Verwendete Reagenzien für molekularbiologische Untersuchungen .....	28
3.1.4	Verbrauchsmaterialien und Geräte .....	30
3.1.5	Software.....	32
3.1.6	Probenmaterial.....	33
3.2	Methoden .....	33
3.2.1	Zellkultur .....	34
3.2.1.1	Isolierung von mesenchymalen Stammzellen aus Fettgewebe.....	34
3.2.1.2	Kultivierung und Subkultivierung von mesenchymalen Stammzellen .....	34
3.2.1.3	Kryokonservierung von MSCs .....	36
3.2.1.4	Auftauen von MSCs .....	36
3.2.1.5	Untersuchung der Multipotenz der caninen Fettgewebstammzellen .....	36
3.2.1.5.1	Osteogene Differenzierung .....	37
3.2.1.5.2	Adipogene Differenzierung.....	37
3.2.1.5.3	Chondrogene Differenzierung .....	38
3.2.1.5.3.1	Anlegen von Pelletkulturen.....	38
3.2.1.5.3.2	Fixation und Vorbereitung der Pellets.....	39
3.2.1.6	Neuronale Differenzierung .....	40
3.2.2	Immunfluoreszenzfärbung für Zellen .....	41
3.2.3	Immunfluoreszenzfärbung für Paraffinschnitte .....	42
3.2.4	Histologische Färbungen.....	43
3.2.4.1	Alizarinrot S-Färbung .....	43
3.2.4.2	Oil Red O-Färbung.....	44
3.2.4.3	Alcianblau-Färbung.....	45
3.2.5	Molekularbiologische Untersuchungen.....	46
3.2.5.1	RNA-Extraktion .....	46

3.2.5.2	cDNA-Synthese und Reverse Transkriptase .....	46
3.2.5.3	Qualitative Polymerase-Kettenreaktion .....	47
3.2.5.4	Gelelektrophorese.....	49
3.2.5.5	Quantitative realtime PCR (qRT-PCR) .....	50
3.2.5.5.1	Statistische Auswertung.....	51
3.3.5.6	Western Blot .....	53
3.3.5.6.1	Gießen der Gele .....	53
3.3.5.6.2	Probenvorbereitung .....	54
3.3.5.6.3	Auftragen der Proben.....	54
3.3.5.6.4	SDS-Gelelektrophorese .....	55
3.3.5.6.5	Blotting.....	55
3.3.5.6.6	Antikörperinkubation .....	56
3.3.5.6.7	Entwickeln des Blots .....	58
4.	Ergebnisse .....	59
4.1	Charakterisierung der cASCs .....	59
4.1.1	Kultivierung und Morphologie von undifferenzierten cASCs .....	59
4.1.2	Expression stammzellspezifischer Marker .....	59
4.1.3	Pluripotenz der Stammzellen.....	61
4.1.3.1	Osteogene Differenzierung .....	61
4.1.3.2	Adipogene Differenzierung.....	62
4.1.3.3	Chondrogene Differenzierung .....	63
4.2	Neuronale Differenzierung der cASCs.....	65
4.2.1	Morphologie von neuronal differenzierten cASCs.....	65
4.2.1.1	Morphologie der cASCs nach 3 Stunden neuronaler Differenzierung.....	66
4.2.1.2	Morphologie der cASCs nach 24 Stunden neuronaler Differenzierung .....	67
4.2.1.3	Morphologie der cASCs nach 72 Stunden neuronaler Differenzierung .....	68
4.2.1.4	Morphologie der cASCs nach 7 Tagen neuronaler Differenzierung .....	68
4.2.2	Immunhistochemie .....	69
4.2.3	Molekularbiologische Ergebnisse .....	72
4.2.3.1	Überprüfung der PCR-Produkte in der Gelelektrophorese.....	72
4.2.3.2	Expression neuronaler und glialer Marker .....	73
4.2.3.3	Expression der Neurotrophine.....	75
4.2.3.4	Expression der Marker im caninen Hirngewebe .....	77
4.2.3.5	Expressionsunterschiede zwischen Spenderindividuen .....	77
4.2.3.6	Ergebnisse des Western Blots .....	78
4.3	Statistische Ergebnisse .....	79

4.3.1	Expressionsmuster im Differenzierungsverlauf.....	79
4.3.2	Expression neuronaler Marker in differenzierten und undifferenzierten cASCs .....	81
5.	Diskussion.....	83
5.1	Diskussion der Methode .....	83
5.1.1	Zusätze des neuronalen Mediums .....	84
5.1.2	Der Hund als Stammzellspender .....	86
5.1.3	Einfluss der Spender auf das Differenzierungspotenzial von cASCs .....	87
5.1.4	Einfluss des Kultivierungsmediums auf cASCs.....	87
5.1.5	Einfluss der Zellpassage auf cASCs.....	88
5.2	Diskussion der Ergebnisse .....	89
5.2.1	Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung der cASCs .....	89
5.2.1.1	Die osteogene Differenzierung .....	90
5.2.1.2	Die adipogene Differenzierung .....	91
5.2.1.3	Die chondrogene Differenzierung .....	92
5.2.2	Die Morphologie neuronal differenzierter cASCs .....	92
5.2.3	Molekularbiologische Ergebnisse .....	93
5.2.4	Immunhistochemische Untersuchung.....	97
5.2.5	Neuronale Marker in undifferenzierten Zellen .....	98
5.2.6	Expression neuraler Marker im Hundegehirn .....	99
5.3	Neuronale Differenzierung oder Artefakt? .....	100
5.4	Ausblick.....	104
6.	Zusammenfassung .....	105
7.	Summary .....	107
8.	Erklärung .....	108
9.	Danksagung .....	109
10.	Literaturverzeichnis .....	110

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Bindungscharakteristik der Neurotrophine für spezifische Rezeptoren.....	12
<b>Abbildung 2:</b> Differenzierungspotenzial von mesenchymalen Stammzellen aus dem Fettgewebe. ....	19
<b>Abbildung 3:</b> Morphologie von cASCs. ....	59
<b>Abbildung 4:</b> Gelelektrophorese der PCR-Produkte für die Oberflächenmarker CD105 und CD90.....	60
<b>Abbildung 5:</b> Gelelektrophorese der PCR-Produkte für die Oberflächenmarker CD105 und CD90.....	61
<b>Abbildung 6:</b> Alizarinrot-Färbung der cASCs nach 7 und 14 Tagen. ....	62
<b>Abbildung 7:</b> Oil Red O-Färbung der cASCs nach 7 und 14 Tagen. ....	63
<b>Abbildung 8:</b> Alcianblau-Färbung der cASCs nach 21 Tagen. ....	64
<b>Abbildung 9:</b> Morphologie neuronal differenzierter cASCs nach 1h. ....	66
<b>Abbildung 10:</b> Morphologie neuronal differenzierter cASCs nach 3h. ....	67
<b>Abbildung 11:</b> Morphologie neuronal differenzierter cASCs nach 24h. ....	67
<b>Abbildung 12:</b> Morphologie neuronal differenzierter cASCs nach 72h. ....	68
<b>Abbildung 13:</b> Darstellung einer Kontaktzone der cASCs nach 7 Tagen neuronaler Differenzierung.....	69
<b>Abbildung 14:</b> Immunhistochemische Färbung von cASCs und caninem Hirngewebe mit den Neuronen-spezifischen Antikörpern MAP2 und $\beta$ -III-Tubulin.....	70
<b>Abbildung 15:</b> Immunhistochemische Färbung von cASCs und caninem Hirngewebe mit den Glia-spezifischen Antikörpern A2B5 und GFAP. ....	71
<b>Abbildung 16:</b> Immunhistochemische Färbung von cASCs und caninem Hirngewebe mit dem Antikörper Nestin. ....	72
<b>Abbildung 17:</b> Gelelektrophorese im Anschluss der GAPDH-RT-PCR.....	73
<b>Abbildung 18:</b> Gelelektrophorese im Anschluss der GAPDH-RT-PCR.....	73
<b>Abbildung 19:</b> Expression der neuralen Differenzierungsmarker MAP2, $\beta$ -III-Tubulin, Nestin und GFAP im Differenzierungsverlauf. ....	74
<b>Abbildung 20:</b> Expression der Differenzierungsmarker MAP2, $\beta$ -III-Tubulin und Nestin in neuronal differenzierten cASCs im Differenzierungsverlauf. ....	75
<b>Abbildung 21:</b> Expression der Neurotrophine NGF, BDNF und GDNF im Differenzierungsverlauf.....	76
<b>Abbildung 22:</b> Expression der Neurotrophine NGF, BDNF und GDNF im Differenzierungsverlauf.....	76
<b>Abbildung 23:</b> Expression aller untersuchten Marker im caninen Hirngewebe. ....	77

<b>Abbildung 24:</b> Expression von BDNF für alle neun Spender zum Zeitpunkt 72h nach neuronaler Differenzierung. ....	78
<b>Abbildung 25:</b> Western Blot der Marker $\beta$ -III-Tubulin (A) und GFAP (B) für die Spender Hd 5/14, Hd 12/15 und canines Hirngewebe. ....	79
<b>Abbildung 26:</b> Expression der Marker (A) MAP2, (B) $\beta$ -III-Tubulin und (C) Nestin im Differenzierungsverlauf.....	80
<b>Abbildung 27:</b> Expression der Neurotrophine (A) NGF, (B) BDNF und (C) GDNF im Differenzierungsverlauf.....	81
<b>Abbildung 28:</b> Expression der neuronalen Gene (A) und Neurotrophine (B) in differenzierten und undifferenzierten Zellen.....	82

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Zusammensetzung des Kultivierungsmediums (50 ml) .....	34
<b>Tabelle 2:</b> Zusammensetzung des osteogenen Differenzierungsmediums (10 ml).....	37
<b>Tabelle 3:</b> Zusammensetzung des adipogenen Differenzierungsmediums (10 ml).....	38
<b>Tabelle 4:</b> Zusammensetzung des chondrogenen Differenzierungsmediums (10 ml) .....	39
<b>Tabelle 5:</b> Zusammensetzung des neuronalen Differenzierungsmediums (10 ml) .....	40
<b>Tabelle 6:</b> Verwendete Primärantikörper für die Immunfluoreszenzfärbung .....	42
<b>Tabelle 7:</b> Verwendete Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenzfärbung .....	43
<b>Tabelle 8:</b> Verwendeter Zellkernfarbstoff für die Immunfluoreszenzfärbung .....	43
<b>Tabelle 9:</b> Mastermix DNase Verdau .....	46
<b>Tabelle 10:</b> Mastermix für die cDNA-Synthese .....	47
<b>Tabelle 11:</b> Primersequenz GAPDH .....	48
<b>Tabelle 12:</b> Mastermix PCR .....	49
<b>Tabelle 13:</b> Mastermix qRT-PCR .....	51
<b>Tabelle 14:</b> Verwendete Primer qRT-PCR .....	51
<b>Tabelle 15:</b> Zusammensetzung des Jagow(Tricin)-Minigels.....	53
<b>Tabelle 16:</b> Verwendete Primärantikörper für den Western Blot.....	57
<b>Tabelle 17:</b> Verwendete Sekundärantikörper für den Western Blot.....	57
<b>Tabelle 18:</b> Prozentualer Anteil an un- und differenzierten Zellen im Differenzierungsverlauf.....	66
<b>Tabelle 19:</b> p-Werte für die Marker MAP2, $\beta$ -III-Tubulin und Nestin im Differenzierungsverlauf.....	80
<b>Tabelle 20:</b> p-Werte für die Marker NGF, BDNF und GDNF im Differenzierungsverlauf.....	81
<b>Tabelle 21:</b> p-Werte für die untersuchten Marker im Vergleich zwischen differenzierten und undifferenzierten cASCs .....	82



## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
Aqua bidest.	Zweifach destilliertes Wasser
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ASCs	adipose-derived stem cells
BMSCs	bone-marrow-derived stem cells
bp	Basenpaare
BHA	Butylhydroxyanisol
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
BMP-2	bone morphogenetic protein factor 2
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
cASCs	canine adipose derived stem cells
CD	Cluster of differentiation
cDNA	copy DNA
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
cMSCc	canine mesenchymal stem cell
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESCs	embryonal stem cells
et al.	et alia
for.	forward
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDNF	Glial cell derived neurotrophic factor
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
h	Stunde
HCl	Chlorwasserstoffsäure

---

Hd	Hund
hMSCs	human mesenchymal stem cells
IBMX	Isobutylmethylxanthin
ITS	Insulin-Transferrin-Selenium
kb	kilo base pairs
kDa	Kilodalton
KCl	Kaliumchlorid
LPL	Lipoprotein lipase
M	Molar
MAP2	Mircotubule associated protein 2
mM	Millimol
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MSCs	mesenchymal stem cells
Nestin	Neuroepithelial stem cell protein
NeuN	Hexaribonucleotide Binding Protein-3
NGF	Nerve growth factor
Nm	Nanometer
NSE	Neuron specific enolase
Oct 4	Octamer binding transcription factor 4
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFA	Paraformaldehyd
pmol	Pikomol
PNS	Peripheres Nervensystem
PPAR $\gamma$ 2	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor 2
rev.	reverse
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
RT-qPCR	Quantitative realtime PCR
RUNX 2	Runt-related transcription factor 2
SOX	sex determining region Y (SRY)- box 2
SVZ	Subventrikularzone
TAE	Tris-Acetate-EDTA
TGF- $\beta$	Transforming-growth-factor $\beta$
TNF	Tumornekrosefaktor

---

Trk	Tyrosinkinase
TUJ	Neuron-specific class III beta tubulin
µg	Mikrogramm
µM	Mikromol
µl	Mikroliter
ZNS	Zentrales Nervensystem



# 1. Einleitung

Mesenchymale Stammzellen (mesenchymal stem cells = MSCs) sind multipotente, nicht-hämatopoetische Stammzellen, die die Fähigkeit besitzen, sich in verschiedene Gewebe zu differenzieren. Zudem besitzen sie immunmodulatorische und heilungsfördernde Eigenschaften (Caplan und Dennis 2006). Aufgrund dieser Charakteristika stellt der Einsatz von MSCs in der Human- sowie Veterinärmedizin zur Behandlung unterschiedlichster Erkrankungen ein großes Forschungsgebiet dar.

Der Einsatz von MSCs beim Hund beschränkt sich vor allem auf präklinische Studien an Versuchshunden zur Erforschung der Anwendungsmöglichkeiten am Menschen. Jedoch existieren erste Studien zum therapeutischen Einsatz von MSCs bei Hunden mit orthopädischen Erkrankungen (Ryu et al. 2009). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Transplantation von ASCs zur Verbesserung von Osteoarthritis in erkrankten Hunden beitragen kann (Black et al. 2007).

Die Regenerative Medizin stellt im Bereich der Stammzellforschung ein großes Forschungsgebiet dar. Hierbei ist die Behandlung von verletztem und zerstörtem Gewebe, insbesondere von Nervengewebe, nur sehr eingeschränkt möglich. Aufgrund dessen wird intensiv an Möglichkeiten für einen therapeutischen Einsatz von MSCs in der Neurologie geforscht. Neurologische Erkrankungen wie Rückenmarkstraumata, Epilepsie oder Multiple Sklerose und deren Behandlung sowie Verbesserung und Heilung durch eine stammzellbasierte Therapie sind daher Gegenstand internationaler Forschung. Dafür werden neurale Stammzellen oder MSCs anderer Gewebe, die zuvor neuronal differenziert werden, in das periphere oder zentrale Nervensystem injiziert. Bei den nicht neuronalen Stammzellen, die für diese Forschung und Behandlung eingesetzt werden, handelt es sich hauptsächlich um MSCs aus dem Knochenmark oder dem Fettgewebe.

Es existieren mehrere Studien zur neuronalen Differenzierung von caninen Knochenmarksstammzellen (englisch: canine bone marrow-derived stem cells, cBMSCs), die zeigen, dass sich diese Zellen durch eine neuronale Differenzierung morphologisch verändern (Long et al. 2005; Oda et al. 2013). Zudem exprimieren neuronal differenzierte BMSCs neuronale und gliale Marker (Kamishina et al. 2006). Weiterhin wurde der Einsatz von BMSCs bei Verletzungen des zentralen Nervensystems beim Hund untersucht (Jung et al. 2009; Ryu et al. 2009).

Untersuchungen zur neuronalen Differenzierungsfähigkeit adipogener caniner Stammzellen (adipose-derived stem cells = ASCs) sind allerdings rar. Hierbei muss zunächst die Frage

geklärt werden, ob und wie sich canine Stammzellen aus dem Fettgewebe neuronal differenzieren lassen. Das neuronale Differenzierungspotenzial caniner Stammzellen aus dem Fettgewebe soll daher Gegenstand der vorliegenden Arbeit sein.

Ziel dieser Arbeit ist es, zunächst die Differenzierungskapazität undifferenzierter caniner Stammzellen aus dem abdominalen Fettgewebe zu untersuchen. Hierfür werden die Zellen in eine adipogene, chondrogene und osteogene Richtung differenziert und weiterhin auf die Expression von Zelloberflächenmarkern untersucht. Anschließend erfolgt die Untersuchung des neuronalen Differenzierungspotenzials der cASCs mithilfe morphologischer Methoden, molekularbiologischer Analysen zur Gen- und Proteinexpressionen neuronaler, glialer und neurotropher Faktoren und schließlich mittels Immunhistochemie. Dabei sollen folgende Fragen geklärt werden:

- Lassen sich canine Stammzellen aus dem Fettgewebe adipogen, chondrogen und osteogen differenzieren?
- Exprimieren diese isolierten Zellen Stammzell-spezifische Oberflächenmarker?
- Kommt es durch die neuronale Differenzierung zu einer morphologischen Veränderung der cASCs?
- Wie wirkt sich die neuronale Differenzierung auf die Genexpression neuronaler Markergene der cASCs aus? Werden in neuronal differenzierten Zellen auch neuronale Gene exprimiert? Verändert sich die neuronale Expression neuronaler Gene im Laufe der Differenzierung?
- Werden ebenfalls neuronale Proteine in den induzierten Zellen translatiert?

## 2. Literaturübersicht

### 2.1 Stammzellen

Als Stammzellen werden Zellen bezeichnet, die die Fähigkeit der Selbsterneuerung besitzen und sich in verschiedene Gewebe differenzieren können (Hall und Watt 1989; Potten und Loeffler 1990; Weissman 2000). Hinsichtlich der Differenzierungspotenziale wird zwischen adulten und embryonalen Stammzellen unterschieden.

Zu Beginn der Embryonalentwicklung besteht die Zygote aus Blastomeren, die in der Lage sind, sich in jedes Gewebe zu differenzieren und einen vollständigen Organismus zu bilden. Diese Zellen, die eine Blastozyste formen, sind omni- oder totipotent (Gardner und Johnson 1973). Das bedeutet, dass aus diesen Zellen entweder der spätere Embryoblast (der Embryo selbst) oder der Trophoblast hervorgehen kann. Ab dem 8-Zellstadium und somit zum Beginn der Morula differenzieren sich die Blastomerzellen in eine innere (Embryoblast) und eine äußere Zellmasse (Trophoblast) (Gardner und Johnson 1973). Während dieser präimplantativen Phase verlieren die Zellen ihre Totipotenz (Paepe et al. 2014). Der Trophoblast stellt im weiteren Verlauf der Entwicklung zusammen mit mütterlichen Anteilen die Plazenta dar, während sich der Embryoblast mit verschiedenen Geweben zum Embryo und dann zum Fetus entwickelt. Die Zellen des Embryoblasten sind nun von den Trophoblastzellen getrennt und können sich auch nicht mehr in das extraembryonale Gewebe entwickeln. Die Zellen des Embryoblasten werden als pluripotente Zellen bezeichnet. Pluripotenz bedeutet, dass sich Zellen in die drei Keimblätter (Ekto-, Ento- und Mesoderm) des Embryos entwickeln können (Paepe et al. 2014). Diese Zellen der Blastozyste werden auch als embryonale Stammzellen bezeichnet (embryonic stem cells, ES-Zellen) (Chung et al. 2006).

Adulte Stammzellen sind ebenfalls pluripotent, besitzen aber im Vergleich zu embryonalen Stammzellen ein geringeres Differenzierungspotenzial. Zunächst wurde angenommen, dass sich adulte MSCs nur in das Gewebe differenzieren können, aus dem sie stammen und die Kapazität ihrer Differenzierung somit stark limitiert ist. Dies wurde jedoch anhand zahlreicher Studien widerlegt, die zeigten, dass sich adulte MSCs in Zellen endodermaler, mesodermaler und ektodermaler Herkunft differenzieren können (Gussoni et al. 1999; Pittenger et al. 1999; Kotton und Fine 2003).

### 2.1.1 Mesenchymale Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen sind nicht-hämatopoetische Zellen, die in der Lage sind, sich zu Zelltypen verschiedener Gewebe zu differenzieren (Caplan 1991; Chamberlain et al. 2007). Sie sichern somit gewebe- und organspezifisch den Ersatz differenzierter Zellen und übernehmen eine wichtige Funktion in der Homöostase, Gewebereparatur und Regeneration eines Organismus. Den ersten Beweis für die Existenz von adhärent wachsenden, fibroblast-ähnlichen Zellen im Knochenmark mit großem Proliferationspotenzial erfolgte durch Friedenstein et al. (Friedenstein et al. 1976). Weitere Untersuchungen ergaben, dass adulte Stammzellen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und zur Differenzierung in unterschiedliche Gewebe wie Knochen und Knorpel (Caplan 1991), Fettgewebe, und Sehngewebe besitzen (Chamberlain et al. 2007; Uccelli et al. 2008, Rastegar et al. 2010). Aufgrund dessen, dass all die genannten Gewebe ursprünglich dem Mesoderm entstammen und sich die untersuchten Zellen in diese Gewebe entwickeln können, definierte man diese Zellen auch als mesenchymale Stammzellen (englisch: mesenchymal stem cells, MSCs). Mesenchymale Stammzellen wurden für *in vitro* Studien bislang aus Knochenmark, Knochen-Bohrmehl (Wenisch et al. 2005), Fettgewebe (Zuk et al. 2002), Amnionflüssigkeit (Anker et al. 2003), Periost (Nakahara et al. 1991) und fetalem Gewebe (Campagnoli et al. 2001) isoliert. Mesenchymale Stammzellen finden sich in Geweben wie Knochenmark, Fett, Skelettmuskulatur, Leber, Lunge, Epidermis und dem Nervensystem (Hall und Watt 1989; Potten und Loeffler 1990; Tropepe et al. 2000). Dabei wurden MSCs nicht nur aus humanem Gewebe, sondern auch aus Mäusen, Ratten, Hunden, Katzen, Schweinen, Kaninchen, Schafen, Pferden und Affen gewonnen (Javazon et al. 2004; Mattos Carvalho et al. 2009). Es ist inzwischen bewiesen, dass MSCs auch in adulten Geweben fortbestehen (Woodbury et al. 2000).

Mesenchymale Stammzellen haben über ihr Differenzierungspotenzial und die Fähigkeit zur Selbsterneuerung hinaus weitere Eigenschaften. So ist die Morphologie von mesenchymalen Stammzellen *in vitro* heterogen, die Zellen zeigen entweder eine spindelförmige, Fibroblasten-ähnliche oder eine flache Gestalt (Javazon et al. 2004).

Eine weitere Eigenschaft von mesenchymalen Stammzellen ist ihre antiinflammatorische und immunregulatorische Wirkung. Das bedeutet, dass bei allogener Transplantation, der Übertragung von Zellen oder Geweben zweier genetisch unterschiedlicher Individuen, keine Immunsuppression notwendig ist. Zudem untersuchten verschiedene Gruppen die immunsuppressiven Eigenschaften der MSCs und zeigten, dass mesenchymale Stammzellen Einfluss auf die Aktivität von T-Lymphozyten haben (Bartholomew et al. 2002; Di Nicola et al. 2002).

Mesenchymale Stammzellen besitzen ebenfalls die Fähigkeit zur Migration. Somit können sie in Gewebe und hier vor allem zu Orten der Gewebsschädigung migrieren (Chamberlain



et al. 2007). Die Mechanismen der Migration sind noch nicht vollends verstanden, es wird aber vermutet, dass Chemokine und deren Rezeptoren in diesem Prozess eine Rolle spielen, da Chemokine wichtige Faktoren in der Kontrolle von Zellmigration sind (Chamberlain et al. 2007). Aufgrund dieser Eigenschaften sind Stammzellen ein vielversprechendes Mittel im Einsatz für verschiedene Erkrankungen, insbesondere für die Regeneration von Geweben (Rastegar et al. 2010). Im Bereich der Therapieentwicklung gegen Erkrankungen wie zum Beispiel Knochen-, Knorpel- und Sehneeffekte, systemische Skeletterkrankungen, Herzerkrankungen oder neurodegenerative Erkrankungen spielt die weitere Erforschung mesenchymaler Stammzellen daher eine große Rolle (siehe Kapitel 2.1.6).

### 2.1.2 Kriterien für MSCs in *in vitro* Studien

Da es kompliziert ist, Ergebnisse von Studien mit unterschiedlichen Isolations- und Kultivierungsprotokollen zu vergleichen, wurden Kriterien für mesenchymale Stammzellen definiert (Dominici et al. 2006). MSCs müssen die Eigenschaft besitzen, in Kultur Plastik-adhärenz zu sein (Dominici et al. 2006). Des Weiteren müssen MSCs ein bestimmtes Expressionsmuster für Oberflächenmoleküle (CD = Cluster of differentiation-Molekül) zeigen: MSCs sind negativ für die Oberflächen-Antigene CD45, CD34, CD14 und CD11 und werden durch eine positive Expression der Marker CD90, CD105, CD44, CD73 und CD71 charakterisiert (Haynesworth et al. 1992, Dominici et al. 2006, Chamberlain et al. 2007). Hierbei sollte jedoch beachtet werden, dass die Expressionsmuster hinsichtlich Spezies, Gewebe und Kulturbedingungen variieren können (Gronthos et al. 2001; Peister et al. 2004; Javazon et al. 2004). Zuletzt müssen mesenchymale Stammzellen auch die Fähigkeit besitzen, sich in unterschiedliche Gewebe wie Knorpel, Knochen und Fett zu differenzieren (Dominici et al. 2006; Chamberlain et al. 2007; Rastegar et al. 2010).

### 2.1.3 Differenzierung von Stammzellen *in vitro*

Um das Differenzierungspotenzial zu überprüfen, ist es üblich, MSCs osteogen, adipogen und chondrogen zu induzieren (Dominici et al. 2006). Dies geschieht mithilfe verschiedener Differenzierungsprotokolle und -faktoren. Das Ergebnis der Differenzierung kann anhand von verschiedenen Färbungen sowie molekularbiologischen Methoden überprüft werden. Bisweilen ist es ebenfalls gelungen, mesenchymale Stammzellen in andere Zelltypen zu

differenzieren. So gelang Woodbury et al. die Differenzierung zu neuron-ähnlichen Zellen und Pittenger et al. konnten mesenchymale Stammzellen zu Tenozyten differenzieren (Pittenger et al. 1999; Woodbury et al. 2000).

#### 2.1.3.1 Osteogene Differenzierung von Stammzellen

Bei der osteogenen Differenzierung werden mesenchymale Stammzellen mit Ascorbinsäure,  $\beta$ -Glycerolphosphat und Dexamethason für zwei bis drei Wochen inkubiert. In dieser Zeit bilden die Zellen Aggregate oder Knötchen, die auch als „nodules“ bezeichnet werden (Pittenger et al. 1999). Osteogen differenzierte MSCs weisen eine erhöhte Expression der Alkalischen Phosphatase und eine Akkumulation von Calcium auf (Pittenger et al. 1999). Anhand der von Kossa- und Alizarin Rot-Färbung können die Zellaggregate angefärbt werden.

#### 2.1.3.2 Adipogene Differenzierung von Stammzellen

Zur Induktion der adipogenen Differenzierung werden Dexamethason, Insulin, Isobutylmethylxanthin und Indomethacin verwendet. Im Laufe der Differenzierung bilden sich innerhalb der Zellen Lipidvakuolen (Pittenger et al. 1999). Charakteristisch für adipogen differenzierte Zellen ist die Expression des Peroxisom-Proliferation-aktivierten-Rezeptors  $\alpha 2$  (PPAR $\alpha 2$ ), der Lipoproteinlipase (LPL) und des fettsäurebindenden Proteins aP2 (Pittenger et al. 1999). Die Akkumulation der Lipide innerhalb der Vakuolen kann mit der Oil Red O-Färbung sichtbar gemacht werden.

#### 2.1.3.3 Chondrogene Differenzierung von Stammzellen

Für die Induktion der chondrogenen Differenzierung werden MSCs zu einem Zellpellet zentrifugiert und mit dem transformierenden Wachstumsfaktor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) kultiviert (Mackay et al. 1998) (Sekiya et al. 2001). Das Zellpellet entwickelt eine mehrschichtige, matrixreiche Morphologie und anhand der Toluidinblau-Färbung kann eine Anhäufung von Glykosaminoglykanen innerhalb der extrazellulären Matrix festgestellt werden (Mackay et al. 1998). Chondrogen differenzierte Stammzellen zeigen außerdem die Expression von Kollagen Typ 2, welches typisch für Gelenkknorpel ist (Pittenger et al. 1999).

#### 2.1.4 Neurale Stammzellen

Neurale Stammzellen (NSCs: neural stem cells) sind Stammzellen des zentralen Nervensystems, die die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen und in die drei Hauptzelltypen des ZNS differenzieren können: Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten (Reynolds und Weiss 1992; Davis und Temple 1994, Johansson et al. 1999). Solche Zellen konnten bislang aus dem embryonalen, fetalen und adulten Nervensystem isoliert und in verschiedene Gewebe differenziert werden (Reynolds und Weiss 1992; Rao und Mayer-Proschel 1997; Mujtaba et al. 1999; Gage 2000; Galli et al. 2000; Weiner 2008).

Neurale Stammzellen teilen sich entweder symmetrisch und erhöhen somit die Anzahl des Stammzellenpools, oder es erfolgt eine asymmetrische Teilung zu Vorläuferzellen, aus denen die verschiedenen Nervenzellen hervorgehen (Kennea und Mehmet 2002).

Die neuralen Stammzellen, die sich aus den Neuroektodermzellen bilden, teilen sich an der ventrikulären Oberfläche des Neuralrohres und formen eine ventrikuläre Zone (Merkle und Alvarez-Buylla 2006). Diese Zellen teilen sich symmetrisch, um den Zellpool zu erhöhen und später auch asymmetrisch. Bei der asymmetrischen Zellteilung entsteht eine Zelle, die in der ventrikulären Zone verbleibt sowie eine Tochterzelle, die nach außen zu ihrem Zielort migriert (Haubensak et al. 2004). Bildungsorte der neuralen Stammzellen sind neben dem Neuroektoderm für embryonale NSCs auch der Gyrus dentatus des Hippocampus (Weiner 2008). Adulte neuronale Stammzellen finden sich vor allem in der subventrikulären Zone der lateralen Ventrikel, der subgranulären Zone des Gyrus dentatus sowie dem Bulbus olfactorius (Vescovi et al. 2001). Darüber hinaus lassen sich adulte NSCs in kleineren Mengen auch in der Amygdala, in der Substantia nigra, dem Rückenmark und dem Neocortex finden (Bedard et al. 2002; Bernier et al. 2002; Zhao et al. 2003).

Aus den ursprünglichen Neuroektodermzellen differenzieren sich auch Radialgliazellen (Anthony et al. 2004). Sie reifen zu Astrozyten-ähnlichen Zellen heran, stellen die neuralen Vorläuferzellen dar und generieren durch Teilung und Differenzierung Neurone oder Oligodendrozyten (Merkle und Alvarez-Buylla 2006). Die Radialglia bilden mit ihren Fortsätzen aus der ventrikulären Zone heraus eine Art Wanderweg für die Nervenzellen, damit diese zu ihrem Zielort migrieren können (Kettenmann und Verkhratsky 2011). In der späteren Entwicklung bilden sich die Radialglia zu reifen Astrozyten um. Einige der Radialglia behalten die Eigenschaft bei, neurale Zellen zu generieren (Kettenmann und Verkhratsky 2011). Wie Astrozyten exprimieren diese Zellen das Intermediärfilament GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein).

Im Laufe der Entwicklung verändern neurale Stammzellen ihre Morphologie und produzieren unterschiedliche Nachkommen. Ebenso können sich auch die Expressionsmuster für verschiedene Gene ändern (Abramova et al. 2005).

### 2.1.5 Neurogenese

Unter der Neurogenese versteht man die Entwicklung des Nervensystems von Organismen. Dabei handelt es sich um eine stufenweise Ausbildung verschiedener zellulärer Komponenten sowie um die Differenzierung zu vollständig ausgebildeten Nervenzellen.

Zu Beginn der Neurogenese entsteht aus dem Neuroektoderm die sogenannte Neuralplatte, die dorsal des Embryos dessen Mittellinie bildet. Aus der Neuralplatte entsteht durch Krümmung der Zellen die Neuralrinne, die an den Seiten durch Zellwucherungen von Neuralfalten begrenzt ist. Die Neuralrinne bildet sich durch Wachstum und Proliferation der Neuroektodermzellen zum Neuralrohr aus, welches sich in weiteren Differenzierungsschritten schließt. Aus den Neuralfalten entstehen die Neuralfurchen, welche sich wiederum zu den Neuralleisten entwickeln, die aus Neuralleistenzellen (englisch: neural crest stem cells, NCSCs) bestehen. Das Neuralrohr umgibt den Zentralkanal, der sich zum späteren Ventrikelsystem und dem Spinalkanal entwickelt. Differenzierungen der Neuroektodermzellen führen durch verschiedene intrinsische und extrinsische Signale und Faktoren, welche bislang nicht vollständig bekannt sind, zunächst zur Ausbildung von neuronalen Stammzellen, die sich im weiteren Verlauf zu Neuronen und Gliazellen ausbilden. Neben den neuronalen Stammzellen, die das spätere zentrale Nervensystem bilden, übernehmen auch die Zellen der Neuralleisten eine wichtige Funktion. Diese Zellen generieren Vorläuferzellen, aus denen das periphere Nervensystem entsteht (Kalchauer 2000). Die Entwicklung der NCSCs erfolgt über verschiedene Stadien: frühe Spezifizierung dieser Zellen aus der Neuralplatte, dorsale Proliferation der Zellen auf dem Neuralrohr, Trennung der Zellen vom Neuralrohr und Ausbildung von Neuralleisten (Garcia-Castro und Bronner-Fraser 1999). Diese Trennung beziehungsweise Abwanderung der Zellen vom Neuralrohr wird als Delamination bezeichnet. Ihr zugrunde liegt ein Expressionsrückgang verschiedenster neuraler Adhäsionsmoleküle wie NCAM oder N-Cadherin (Pla et al. 2001). Aufgrund dieser Regulationsprozesse wandern die NCSCs vom Neuralrohr ab. Neuralleistenzellen besitzen wie auch NSCs die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und können sich in unterschiedliche Zelltypen entwickeln. Sie unterscheiden sich von NSCs in ihrer Fähigkeit, über lange Distanzen zu migrieren und in mesenchymale Entwicklungslinien zu differenzieren (Kennea und Mehmet 2002).

#### 2.1.5.1 Embryonale Neurogenese

Im weiteren Verlauf der Neurogenese spielt eine bestimmte Untergruppe der neuronalen Stammzellen eine zentrale Rolle in der Entwicklung des Gehirns. Diese Zellen zeigen eine

radiale Morphologie und werden auch als Radialglia bezeichnet (Barres 1999; Noctor et al. 2001; Gregg et al. 2002). Aus der Zellteilung neu generierte Zellen wandern entlang der radial wachsenden Fortsätze der Radialglia aus der Ventrikularzone in Richtung ihres endgültigen Zielortes. Hier teilen und differenzieren sich diese Zellen weiter. Gliazellen und Neurone können aus denselben Vorläuferzellen hervorgehen. Die gliale und neuronale Determination hängt von verschiedenen extrinsischen Faktoren und Formen der transkriptionalen Aktivierung ab (Tanabe und Jessell 1996; Jessell 2000). Eine wichtige Rolle in der neuronalen Differenzierung spielt das antiproliferative Gen PC3, das mit der „Geburtsstunde der Nervenzelle“ in Verbindung gebracht wurde (Iacopetti et al. 1994). Die Expression von PC3 führt zur Expression der neuronalen Marker  $\beta$ -III-Tubulin und MAP-2 (Canzoniere et al. 2004). Für das Überleben und die Reifung entstehender Neurone sind Wachstumsfaktoren, wie die Neurotrophine FGF (fibroblast growth factor), NGF, BDNF und GDNF, wichtig. Morphologische Veränderungen gehen mit der Ausbildung neuraler Fortsätze und der Bildung von Vernetzungen einher (Bito et al. 2000). Die terminale Differenzierung resultiert schließlich in der Anlage spannungsabhängiger Natrium- und Kaliumkanäle (Kohyama et al. 2001).

#### 2.1.5.2 Postnatale und adulte Neurogenese

Während ein großer Teil der Neurogenese in der embryonalen sowie frühen postnatalen Entwicklung stattfindet, kommt es auch im adulten Säugetier kontinuierlich zur Bildung neuer Nervenzellen. Den ersten Nachweis für die Existenz adulter neuraler Stammzellen machten Altman und Das, die Läsionen in Rattengehirnen durchführten und anschließend die Proliferation von Neuronen beobachteten (Altman und Das 1966). In den darauffolgenden Jahren konnte die adulte Neurogenese auch in anderen Studien nachgewiesen werden (Gage et al. 1995). Im Gehirn gibt es zwei Regionen, in denen adulte neurale Stammzellen gebildet werden: die Subventrikularzone, die sich an der lateralen Wand des Seitenventrikels befindet und der Hippocampus (Song et al. 2002). Innerhalb dieser Regionen befinden sich neurale Stammzellen, die sich unbegrenzt teilen können und Tochterzellen generieren. Die Tochterzellen besitzen die Fähigkeit, sich in die verschiedenen Zelltypen einer Nervenzelle zu differenzieren. Hierzu gehören die Gliazellen, die sich durch weitere Differenzierungen zu Astrozyten oder Oligodendrozyten spezialisieren, und die Neurone.

Die Entwicklung und Bildung neuer Nervenzellen im Hippocampus verläuft in drei Stadien, die man als Proliferation, neuronale Determination und Reifung benennt (Bischofberger und Schmidt-Hieber, 2006). In diesen Stadien bilden sich aus neuronalen Stammzellen neuronale Vorläuferzellen, die sich zunächst weiter teilen. Sie entwickeln sich schließlich zu

postmitotischen Neuronen. All diese Abläufe gehen mit unterschiedlichen zellulären Prozessen einher.

Innerhalb des Gyrus dentatus, einem Teil des Hippocampus, befinden sich neurale Stammzellen. Der Zellkörper dieser Zellen liegt in der subgranulären Zone, während ein langer Dendrit durch die Körnerzellenschicht bis in die Molekularschicht reicht. In dieser Schicht verzweigt er sich in viele kleine Fortsätze (Filippov et al. 2003; Fukuda et al. 2003). Charakteristisch für diese neurale Stammzellen ist die Expression von Nestin und GFAP. Aus den neuronalen Stammzellen entstehen durch asymmetrische Teilung neurale Vorläuferzellen, die weiterhin Nestin exprimieren, aber nicht mehr GFAP-positiv sind (Filippov et al. 2003). Die neuronalen Vorläuferzellen teilen sich vermehrt und lassen so eine Vielzahl neugebildeter Zellen entstehen. Allerdings ist die Fähigkeit zur Teilung bei diesen Zellen wohl auf einen bestimmten Zeitraum beschränkt, weswegen die neuronalen Stammzellen immer neue Vorläuferzellen hervorbringen (Bischofberger und Schmidt-Hieber, 2006). Die Proliferation der Vorläuferzellen wird durch Wachstumsfaktoren und Neurotransmitter wie zum Beispiel BDNF und Serotonin, reguliert. Weiterhin beginnen diese Zellen, GABA- und NMDA-Rezeptoren zu exprimieren, die für die spätere synaptische Übertragung und Kommunikation notwendig sind (Wang et al. 2005). Die neuronalen Vorläuferzellen reifen innerhalb von vier Wochen zu jungen, postmitotischen Neuronen heran. In dieser Zeit exprimieren die Neurone weitere neuronale Proteine sowie typische neuronale Ionenkanäle. Die jungen Neurone bilden GABAerge und glutamaterge erregende Synapsen aus (Wang et al. 2005; Ge et al. 2006). Morphologische Veränderungen gehen mit dem Wachstum von Axonen und Dendriten in den ersten Tagen nach der Zellteilung einher (Bischofberger und Schmidt-Hieber, 2006). Die spezifische neuronale Aktivität im Hippocampus beeinflusst die neuronale Determination und die Reifung der jungen Neurone. Auch bei Menschen im Alter von über 70 Jahren konnten noch neu gebildete Neurone im Hippocampus nachgewiesen werden (Eriksson et al. 1998; Jin et al. 2004). Die adulte Neurogenese ist vor allem im Hippocampus demnach insofern interessant, als dass diese Region entscheidend für das Lernen und die Gedächtnisleistung ist.

Die Subventrikularzone (SVZ) enthält ebenfalls proliferierende neurale Stammzellen. Die Nachkommen dieser Stammzellen migrieren aus der SVZ entlang eines rostralen Trakts zum Bulbus olfactorius und entwickeln sich hier weiter in Interneurone (Pencea et al. 2001). Die migrierenden neuronalen Vorläuferzellen, auch Typ A-Zellen genannt, exprimieren Nestin, einen Marker für neurale Vorläuferzellen, und  $\beta$ -III-Tubulin, ein Neuronen-spezifisches Tubulin.

### 2.1.6 Neurotrophine

Neurotrophine sind eine Gruppe von Wachstumsfaktoren, die an der embryonalen und adulten Neurogenese beteiligt sind (Gould und Enomoto 2009). Der Begriff der Neurotrophine geht auf die Neurotrophinhypothese von Levi-Montalcini, Hamburger und später auch Purves zurück (Hamburger 1958; Northcutt 1989). Levi-Montalcini und Hamburger entdeckten, dass Ganglien je nach Körperregion ein unterschiedlich starkes Wachstum zeigten, teilweise aber ohne erkennbaren Grund abstarben (Hamburger und Levi-Montalcini 1949). Daraufhin postulierten sie die Existenz neurotropher Faktoren, die von adulten Nervenzellen gebildet und von sich entwickelnden, unreifen Neurone aufgenommen werden. Neurone, die erfolgreich Synapsen und synaptische Verbindungen bilden, erlangen ausreichend trophische Faktoren, um überleben zu können. Andererseits unterliegen Neurone, die nicht genügend dieser Faktoren erhalten, dem programmierten Zelltod, der Apoptose. Demzufolge sollten neurotrophe Faktoren (englisch: neurotrophic factors, NTFs) existieren, die das Überleben und den Zelltod einer Zelle beeinflussen. Oppenheim schätzte, dass sterbende Neurone während ihrer Entwicklung ein bestimmtes Programm von Genen aktivieren und dass NTFs dieses Programm beeinflussen und inhibieren können (Oppenheim 1991).

Neurotrophine werden im zentralen und im peripheren Nervensystem von einzelnen Neuronen und neuron-assoziertem Gewebe wie Gliazellen und Schwannzellen gebildet (Levi-Montalcini et al. 1995; Lewin und Barde 1996).

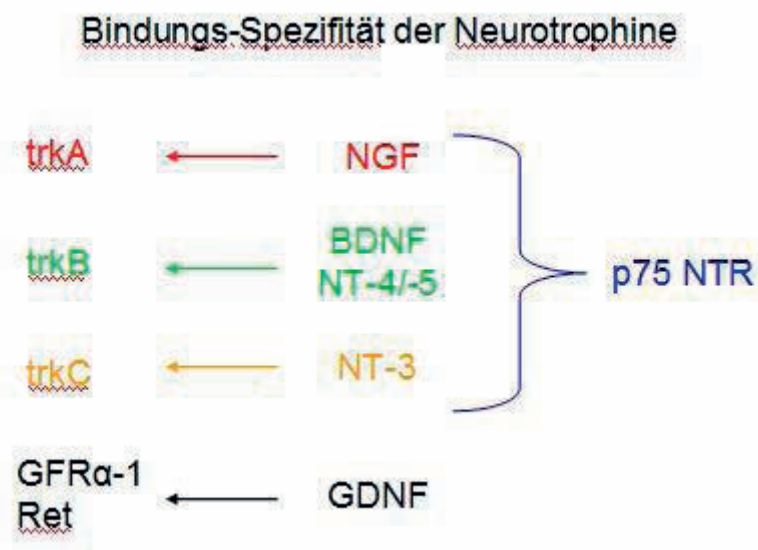
Sie dienen dem Überleben, der Zellproliferation und der Differenzierung sowie dem Wachstum von Axonen und Dendriten von embryonalen und adulten Nervenzellen (Lu et al. 2005; Reichardt 2006). Dabei übernehmen sie schon zu Beginn der neuronalen Differenzierung und Entwicklung verschiedene regulatorische Funktionen. Neurotrophine fördern nicht nur die Differenzierung von embryonalen neuralen Stammzellen, sondern haben auch Einfluss auf adulte NSCs (Benraiss et al. 2001; Scharfman et al. 2005). Des Weiteren fördern Neurotrophine die Synaptogenese und regulieren die funktionelle und morphologische Reifung von Synapsen (Sanes und Lichtman 1999). Dieser modulierende synaptische Effekt der Neurotrophine wurde erstmals in Kulturen von Myozyten und Rückenmarksneuronen von *Xaenopus laevis* entdeckt. Hier führte die Addition verschiedener Neurotrophine zu einem Anstieg in der synaptischen Aktivität (Lohof et al. 1993). Dieser Einfluss der Neurotrophine auf die Synaptogenese und die Regulierung synaptischer Aktivität stimmt damit überein, dass Neurotrophine die Expression synaptischer Proteine, wie Enzyme und Neurotransmitter, begünstigen (Vicario-Abejon et al. 2002).

Neurotrophine binden an zwei unterschiedliche Rezeptoren. Zum einen können sie an den weniger affinen p75<sup>NTR</sup>-Rezeptor der TNF-Familie (Tumornekrosefaktor) binden (Chao 2003). Mit einer Bindung an diesen Tumornekrosefaktor können Neurotrophine die Apoptose

induzieren (Bamji et al. 1998; Casaccia-Bonnel et al. 1998). Spezifische Bindungen gehen die einzelnen Neurotrophine mit den Trk-Rezeptoren (Tyrosinkinase-Rezeptoren) ein, zu denen TrkA, TrkB und TrkC gehören (Barbacid 1995; Chao 2003). Die Bindung an die Trk-Rezeptoren resultiert in der Aktivierung der Tyrosinkinasen und reguliert somit eine Signalübertragung. Die Bindungsspezifität der Neurotrophine ist in Abbildung 1 dargestellt.

Im Laufe der letzten Jahre wurde durch weitergehende Forschung mit Neurotrophinen deren neurotrophe Wirkung in nicht-neuronalem Gewebe untersucht. So sind Fibroblasten, Immunzellen und glatte Muskelzellen zur Neurotrophinsynthese fähig. Ebenfalls konnte eine Wirkung von Neurotrophinen auf solche nicht-neuronale Zellen nachgewiesen werden (Nemoto et al. 1998).

Bekannte Neurotrophine sind der *nerve growth factor* (NGF), der *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), der *glial cell derived neurotrophic factor* (GDNF) und die Neurotrophine 3 und 4 (NT3, NT4). Da in der vorliegenden Arbeit die Expressionen von NGF, BDNF und GDNF untersucht wurden, wird an dieser Stelle detailliert auf diese Faktoren eingegangen.



**Abbildung 1:** Bindungscharakteristik der Neurotrophine für spezifische Rezeptoren.

#### 2.1.6.1 Nerve growth factor (NGF)

Der *nerve growth factor* war der erste Faktor der Neurotrophin-Familie, der isoliert und kloniert wurde (Levi-Montalcini 1987). Es sollte ein Protein isoliert werden, welches für das Überleben und das Wachstum sympathischer und sensorischer Neurone während der Entwicklung zuständig ist. Die Entdeckung des NGF bestätigte die Neurotrophinhypothese, die besagt, dass Faktoren existieren, die das Überleben oder den Zelltod von Zellen



regulieren (Hamburger 1958; Hamburger und Levi-Montalcini 1949, Northcutt 1989a, 1989b). NGF wird hauptsächlich von Zielzellen sympathischer und sensorischer Neurone synthetisiert, von der unreifen Nervenzelle axonal aufgenommen und retrograd zum Zellkern transportiert. Dort unterstützt es die neuronale Differenzierung (Huang und Reichardt 2001). Nach peripheren Nervenschädigungen können Zytokine die Synthese von NGF in Schwannschen Zellen und Fibroblasten innerhalb des verletzten Gewebes induzieren (Korsching 1993). Der NGF bindet an den TrkA-Rezeptor der Trk-Familie (Chao 2003). Dieser Rezeptor besitzt in Abwesenheit von NGF eine Zelltod-aktivierende Eigenschaft, daher spielt NGF eine große und wichtige Rolle im Überleben der Nervenzellen (Nikolopoulou et al. 2010).

#### 2.1.6.2 Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)

Der *brain-derived neurotrophic factor* wurde von Thoenen und Kollegen aus dem Schweinegehirn isoliert und ist das am häufigsten exprimierte Neurotrophin innerhalb des zentralen Nervensystems (Barde et al. 1982). Es konnte gezeigt werden, dass BDNF den Bestand von sensorischen Neuronen fördert (Barde 1989). Rezeptor für den BDNF ist der TrkB-Rezeptor (Chao 2003). BDNF spielt eine Rolle beim Überleben und bei der Differenzierung von embryonalen neuronalen Stammzellen in Neurone (Ahmed et al. 1995; Shetty und Turner 1998). Allerdings dient BDNF nach dieser neuronalen Differenzierung nicht mehr dem Überleben der Zellen, hingegen aber dem Wachstum von Dendriten (Ahmed et al. 1995).

BDNF hat nicht nur Einfluss auf die Differenzierung embryonaler NSCs, sondern übernimmt auch eine Funktion in der Differenzierung adulter NSCs. Es konnte gezeigt werden, dass eine Infusion von BDNF in den Gyrus dentatus oder die subventrikuläre Zone von Ratten zu einer erhöhten Anzahl von neugebildeten adulten Neuronen führt (Benraiss et al. 2001; Scharfman et al. 2005). Rauskolb et al. fanden in Versuchen mit BDNF-knockout-Mäusen heraus, dass eine Abwesenheit von BDNF zu einer Region-spezifischen Reduktion der Dendritenausbildung führt (Rauskolb et al. 2010). Diese Entdeckung weist darauf hin, dass BDNF kein Überlebensfaktor, sondern vielmehr ein Differenzierungsfaktor für Neurone aus dem ZNS ist. Ein weiterer Beleg dafür ist die Tatsache, dass der TrkB-Rezeptor für BDNF keine Zelltod-aktivierende Fähigkeit besitzt, wie es bei dem TrkA-Rezeptor für den *nerve growth factor* der Fall ist (Nikolopoulou et al. 2010).

BDNF spielt weiterhin eine Rolle bei der Synaptogenese. Es fördert die Bildung exzitatorischer und hemmender Synapsen (Vicario-Abejon et al. 1998) und führt durch Applikation zu einem Anstieg der synaptischen Aktivität (Lohof et al. 1993).

### 2.1.6.3 Glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF)

Der *glial cell derived neurotrophic factor* gehört ebenfalls zur Familie der Neurotrophine und wurde erstmals 1993 von Lin et al. als bedeutender Überlebensfaktor für dopaminerge Neurone isoliert und kloniert. GDNF wird von Schwannschen Zellen und Zellen der Skelettmuskulatur exprimiert (Henderson et al. 1994). In embryonalen Zellkulturen fördert GDNF die morphologische Differenzierung dopaminerge Neurone (Lin et al. 1993). Des Weiteren hat eine erhöhte Expression von GDNF einen positiven Effekt auf Nervenverletzungen (Henderson et al. 1994). In Tiermodellen zur Erforschung der Parkinsonschen Krankheit wurde GDNF in die Substantia nigra oder das Striatum injiziert und verhinderte die Degeneration von dopaminergen Neuronen (Beck et al. 1995; Tomac et al. 1995). Allerdings ist GDNF nicht, wie vorläufig angenommen, ein rein spezifischer neurotrophiner Faktor für dopaminerge Neurone, sondern fördert auch die cholinerge Differenzierung von Motoneuronen *in vitro* (Henderson et al. 1994; Zurn et al. 1994). Er stellt einen der wichtigsten Überlebensfaktoren für Motoneurone dar und fördert das Überleben embryonaler Motoneurone *in vivo* und *in vitro* (Oppenheim 1991; Henderson et al. 1994). GDNF wird weiterhin innerhalb sowie außerhalb des zentralen Nervensystems exprimiert. Im peripheren Nervensystem korreliert die GDNF-Expression mit einer sympathischen, sensorischen und motorischen Innervation (Trupp et al. 1995). Außerdem wird GDNF auch in reproduktiven Organen, wie Ovar und Testikel, exprimiert (Golden et al. 1999). Dies zeigt, dass GDNF im Organismus auch eine nicht neurale Rolle spielt (Arenas et al. 1995). GDNF bindet an den *family receptor alpha 1* (GFR $\alpha$ 1), der einen Glycosylphosphatidylinositol(GPI)-bindenden Zelloberflächenrezeptor darstellt (Airaksinen et al. 1999).

### 2.1.7 Neuronale und gliale Markergene

Neben den Neurotrophinen existieren weitere spezifische neuronale oder gliale Marker, die innerhalb des Nervensystems exprimiert werden. Diese Marker oder neuronalen Faktoren spielen in der Entwicklung und vor allem der Morphologie von Neuronen und Gliazellen eine entscheidende Rolle.

Die Neuritogenese, das Wachstum der Neuriten eines Neurons, und deren Stabilität, Erhaltung und Funktionalität basieren auf folgenden Komponenten des Zytoskeletts: Mikrotubuli (Neurotubuli), Intermediärfilamente (Neurofilamente) und Mikrofilamente (Aktinfilamente) (Pannese, 1994).

### 2.1.7.1 Glial fibrillary acidic protein (GFAP)

Das *glial fibrillary acidic protein* ist ein Intermediärfilament, welches in reifen, ausdifferenzierten Astrozyten des ZNS exprimiert wird (Eng et al. 1971). Allerdings ist GFAP kein spezifischer Marker für Astrozyten, da es außer im ZNS auch noch in Leber, Lunge, Niere und anderen Organen exprimiert wird. GFAP kontrolliert die Bewegung, die Funktion und die Form der Astrozyten.

In höheren Vertebraten kommt es nach Verletzung des ZNS zu der sogenannten Astrogliose, die durch eine erhöhte Expression und einen schnellen Anstieg von GFAP gekennzeichnet ist (Eng et al. 1971). Diese Astrogliose ist das Hauptcharakteristikum von Astrozyten und tritt während und nach Traumata des ZNS auf. Hierzu gehören zum Beispiel die Multiple Sklerose, bei der es zu einer Demyelinisierung der Nervenzellen kommt, die Alzheimersche Krankheit und die Bovine Spongiforme Encephalopathie. Die schnelle Reaktion der Astrozyten auf solche Erkrankungen lässt annehmen, dass diese Zellen eine besondere und wichtige Rolle im ZNS spielen (Eng et al. 2000). Während der Erforschung der Multiplen Sklerose entdeckten Eng et al. das GFAP in fibrösen Astrozyten (Eng et al. 1971). In neueren Studien konnten verschiedene Isoformen von GFAP identifiziert werden, so zum Beispiel das GFAP $\delta$  (Kamphuis et al. 2012), welches in Radialgliazellen während der Entwicklung sowie auch in adulten NSCs exprimiert wird (Mamber et al. 2012).

### 2.1.7.2 Microtubule associated protein 2 (MAP2)

Das *microtubule associated protein 2* wurde 1975 von Weingarten et al. isoliert und gehört zur Gruppe der Mikrotubuli-assoziierten Proteine (MAP) (Weingarten et al. 1975). Es wird im Nervensystem exprimiert und ist vor allem in embryonalen, aber auch in adulten Geweben zu finden. In neuronalen Vorläuferzellen ist die Expression von MAP2 zu Beginn schwach, im weiteren Verlauf der Entwicklung nimmt sie jedoch zu. Dabei ist es das am häufigsten vorkommende MAP im Gehirn. MAP2 ist ein Marker für Neurone und wird vor allem in neuronalen Vorläuferzellen exprimiert. MAP2 ist eine Komponente der dendritischen Ausläufer von Neuronen und spielt im Aufbau von Mikrotubuli sowie bei der Stabilisierung von Dendriten eine Rolle (Goedert et al. 1991). Es ist bei der Brückenbindung zwischen Mikrotubuli oder zwischen Mikrotubuli und Intermediärfilamenten des Zytoskeletts von Bedeutung (Shiomura und Hirokawa 1987; Hirokawa et al. 1988). Eine Hemmung der MAP2-Produktion resultiert in der Hemmung der Neuritenformation und des Neuritenwachstums (Dinsmore und Solomon 1991). Somit ist MAP2 essentiell für das Dendritenwachstum und die Stabilisierung der Mikrotubuli innerhalb der Dendriten. Des Weiteren besitzt MAP2 eine

Bindedomäne für eine Untereinheit für die von dem zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP) abhängigen Proteinkinase A (PKA) (Vallee et al. 1981; Theurkauf und Vallee 1982). MAP2 spielt demnach auch eine Rolle bei der PKA-Signaltransduktion.

### 2.1.7.3 Nestin

Nestin ist ein Intermediärfilamentprotein, welches vor allem von Zellen des ZNS exprimiert wird (Hockfield und McKay 1985; Lendahl et al. 1990). Seinen Namen verdankt es der Entdeckung in neuralen Vorläuferzellen (Akronym: neuroepithelial stem cell protein) (Lendahl et al. 1990). Intermediärfilamente übernehmen in Zellen eine Stützfunktion (Fuchs und Cleveland 1998; Goldman et al. 2008). Des Weiteren spielen sie eine wichtige Rolle in der Anordnung der Organellen innerhalb des Zytoplasmas (Goldman et al. 2008). Sie sichern den Zellen eine flexible Struktur und haben Einfluss auf die von außen auf die Zellen eingreifenden Faktoren (Fuchs und Cleveland 1998; Goldman et al. 2008). In Nervenzellen dient Nestin auch dem radialen Wachstum der Axone. Nestin findet sich aber nicht nur im peripheren und zentralen Nervensystem, sondern wird auch in Muskelvorläuferzellen exprimiert. In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass in Vorläuferzellen von endokrinen und exokrinen Zellen des sich entwickelnden Pankreas Nestin exprimiert wird (Bernardo et al. 2006). Ebenso wurden Nestin-Expressionen in der fetalen Niere (Bertelli et al. 2007), in fetalen Zähnen (About et al. 2000) und in dem sich entwickelnden Hoden (Frojdman et al. 1997; Davidoff et al. 2004) entdeckt. Mit der Bildung ausdifferenzierter Zellen folgte ein Rückgang der Nestin-Expression (Klein et al. 2003; Davidoff et al. 2004).

Innerhalb des ZNS findet sich eine Nestin-Expression vor allem in der frühen Entwicklung in Neuroepithelzellen und neuralen Vorläuferzellen (Cattaneo und McKay 1990). Im adulten Organismus wird Nestin von neuralen Stammzellen in bestimmten Bereichen des Gehirns mit Neurogenese, aber nicht von ausdifferenzierten Nervenzellen exprimiert (Mignone et al. 2004). Die Expression von Nestin kommt in sich teilenden Zellen vor allem in der frühen Entwicklung vor. Nach der Differenzierung der Zellen zu postmitotischen Neuronen wird diese Expression herunterreguliert und durch andere für das entsprechende Gewebe spezifische Proteine ersetzt (Cattaneo und McKay 1990). Die neuralen Stammzellen führen schließlich zu der Bildung von Neuronen und Gliazellen, die nach Differenzierung keine Nestin-Expression zeigen (Lendahl et al. 1990). Während der Neuro- und Gliogenese wird Nestin durch Intermediärfilamente, wie Neurofilamente und GFAP, ausgetauscht (Lendahl et al. 1990). Interessanterweise wird eine Expression von Nestin im adulten Organismus nach Verletzungen des ZNS reinduziert. Bei Läsionen des Hippocampus (Clarke et al. 1994; Abdel-Rahman et al. 2004) und auch bei anderen Verletzungen des Gehirns (Buffo et al.

2008) proliferieren bestimmte Zellen und exprimieren Nestin. Diese Zellen werden z.T. als Astrozyten beschrieben, deren Anzahl im Laufe der Heilung wieder sank (Clarke et al. 1994; Abdel-Rahman et al. 2004). Ansonsten sind adulte neurale Stammzellen für Neurogenese und Astrogligenese verantwortlich (Bennett et al. 2010).

#### 2.1.7.4 Neuron-specific class III beta-tubulin ( $\beta$ -III-Tubulin)

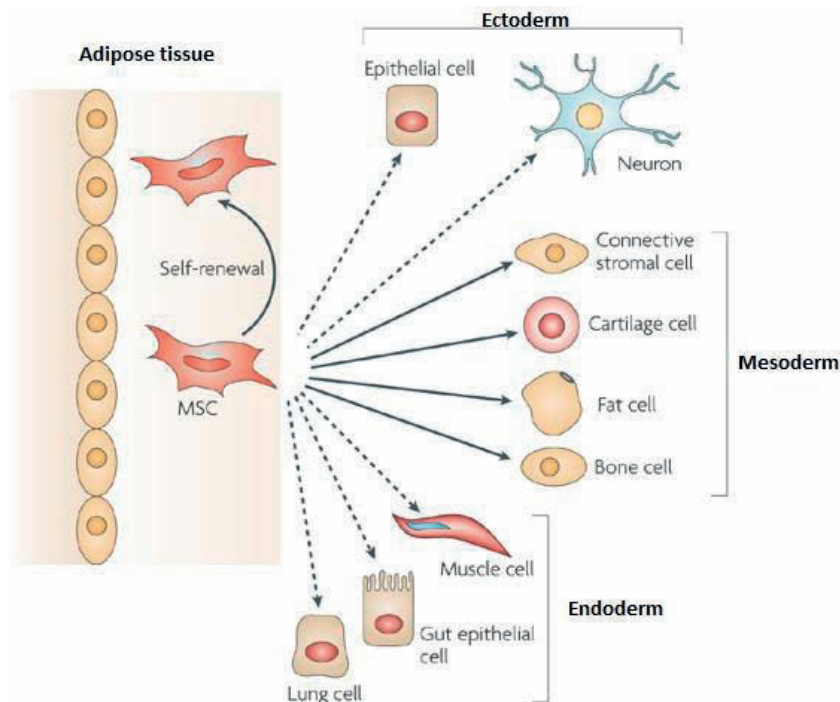
$\beta$ -III-Tubulin ist ein Mitglied der Tubulin-Familie und ein Protein des Zytoskeletts. Es ist Bestandteil der Mikrotubuli in Zellen und interagiert mit Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAPs) (Luduena 1998; Cambray-Deakin et al. 1987). Mikrotubuli sind wichtig für die Erhaltung der Morphologie der Zellen, für die Motilität und die axonale Wegfindung und spielen eine Rolle beim intrazellulären Transport von zytoplasmatischen Bestandteilen (Haendel et al. 1996). Immunhistochemische Färbungen zeigten, dass  $\beta$ -III-Tubulin in Perikarien, Dendriten, Axonen und Axonenenden unreifer Neurone vorkommt (Katsetos et al. 1993).

$\beta$ -III-Tubulin wird während der fetalen und postnatalen Entwicklung in neuronalen Vorläuferzellen, aber auch in der subventrikulären Zone des Telencephalon einschließlich neuronaler und glialer Vorläuferzellen sowie in Zellen der fetalen und adulten Retina exprimiert (Katsetos et al. 1991; Katsetos et al. 2003). Es spielt bei der Differenzierung dieser Vorläuferzellen in Neurone eine bedeutende Rolle (Lee et al. 1990). Im adulten zentralen Nervensystem ist die Verbreitung von  $\beta$ -III-Tubulin Neuronen-spezifisch (Katsetos et al. 2003). Es konnte allerdings gezeigt werden, dass die Expression von  $\beta$ -III-Tubulin im postnatalen Cortex weitaus höher ist als im adulten Cortex (Farina et al. 1999). Weitere nicht-neuronale Expressionen von  $\beta$ -III-Tubulin finden sich in Kulchitsky's Zellen des Atmungsepithels (Katsetos et al. 2000) und in glialen Vorläuferzellen der subventrikulären Zone (Katsetos et al. 2002; Katsetos et al. 2003). In Studien mit kultivierten Neuronen *in vitro* konnte gezeigt werden, dass die Expression von  $\beta$ -III-Tubulin mit der Ausbildung von Dendriten und Axonen sowie der Expression von MAPs korreliert (Ferreira und Caceres 1992). Wegen seiner Expression in Neuronen wird  $\beta$ -III-Tubulin in vielen wissenschaftlichen Studien als neuronaler Marker verwendet (Svendsen et al. 2001).

## 2.2 Mesenchymale Stammzellen aus dem Fettgewebe

Eine erste Beschreibung zur Isolation und Charakterisierung von humanen Stammzellen aus dem Fettgewebe erfolgte durch Zuk et al. (Zuk et al. 2001). *In vitro* zeigten diese Zellen die Fähigkeit, sich in eine adipogene, chondrogene, myogene und osteogene Richtung zu differenzieren.

Fettgewebe stellt eine vielversprechende und ergiebige Quelle für adulte Stammzellen dar (Gimble und Guilak 2003; Nakagami et al. 2006). Diese Zellen werden laut der *International Fat Applied Technology Society* im englischen auch adipose-derived stem cells (ASCs) genannt (Bunnell et al. 2008). ASCs können aus subkutanem Gewebe bei Operationen oder durch Biopsien und Liposuktionen gewonnen werden (Williams et al. 1994; Zuk et al. 2001). Bei ASCs handelt es sich um fibroblasten-ähnliche Zellen (Nakagami et al. 2006), die zu multipotenziellen Differenzierungen fähig sind und bereits aus Mäusen, Kaninchen und Pferden isoliert wurden (Di Rocco et al. 2006; Torres et al. 2007; Vidal et al. 2007). Anhand durchflusszytometrischer und immunhistochemischer Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass humane ASCs eine positive Expression für die Adhäsionsmoleküle CD29 und CD105 sowie für das Rezeptormolekül CD44 und die Oberflächenmoleküle CD13 und CD73 aufweisen (Young et al. 1992; Williams et al. 1994; Zuk et al. 2001). Weiterhin sind sie positiv für das extrazelluläre Glykoprotein CD90 und zeigen eine negative Expression für die hämatopoetischen Marker CD14, CD31 und CD45. ASCs besitzen die Fähigkeit zur multipotenziellen Differenzierung in eine adipogene, chondrogene, myogene, osteogene und neuronale Richtung (Halvorsen et al. 2000; Zuk et al. 2001; Mizuno et al. 2002; Safford et al. 2002; Gimble und Guilak 2003).



**Abbildung 2:** Differenzierungspotenzial von mesenchymalen Stammzellen aus dem Fettgewebe (modifiziert nach Uccelli et al. 2008).

### 2.2.1 Canine mesenchymale Stammzellen aus dem Fettgewebe

Humane adulte Stammzellen werden, wie bereits oben beschrieben, anhand dreier wichtiger Eigenschaften charakterisiert: Sie sind unter Kulturbedingungen Plastik-adhärenz, exprimieren verschiedene Zelloberflächenmarker und besitzen ein Differenzierungspotenzial in die adipogene, chondrogene und osteogene Richtung (Dominici et al. 2006). Im Gegensatz dazu gibt es keine uniforme Charakterisierung für MSCs tierischer Herkunft und damit keine stammzellcharakteristischen Kriterien für Caniden (Dominici et al. 2006). Trotz allem existieren einige Daten zu caninen ASCs, die dieselben Kriterien wie für humane Stammzellen bestätigen (Vieira et al. 2010; Martinello et al. 2011; Takemitsu et al. 2012). Somit können canine mesenchymalen Stammzellen aus dem Fettgewebe des Hundes (englisch: canine adipose-derived stem cells, cASCs) anhand ihrer Morphologie, ihrer Genexpression und ihres Immunphänotyps charakterisiert werden.

Die erste Dokumentation zur Charakterisierung von cASCs erfolgte durch Neupane et al. (Neupane et al. 2008). In Anlehnung an Versuchsprotokolle für humane Fettgewebstammzellen, mit denen die Arbeitsgruppe gearbeitet hatte, wurden canine ASCs isoliert, vermehrt und differenziert. Bei diesen Zellen handelt es sich um spindelförmige Zellen, die die Fähigkeit besitzen, als Monolayer auf Plastik zu wachsen. cASCs zeigen

teilweise unterschiedliche Morphologien. So variieren sie von schlank und schmal zu kubischen Zellen mit kürzeren zytoplasmatischen Fortsätzen (Csaki et al. 2007).

Es konnte zudem gezeigt werden, dass cASCs, als Beweis für ihre Pluripotenz, verschiedene Transkriptionsfaktoren für Stammzellen (NANOG, Sox2 und Oct4) exprimieren (Neupane et al. 2008). Dieser Nachweis konnte durch Studien anderer Arbeitsgruppen bestätigt werden (Guercio et al. 2012; Kisiel et al. 2012).

Des Weiteren ließen sich canine ASCs in die adipogene, chondrogene und osteogene Richtung differenzieren (Neupane et al. 2008; Vieira et al. 2010; Guercio et al. 2012). Vieira et al., Martinello et al. und Guercio et al. erweiterten das Differenzierungspotenzial der cASCs um eine myogene Differenzierung (Vieira et al. 2010; Martinello et al. 2011; Guercio et al. 2012).

Canine ASCs zeigten eine positive Expression der Zelloberflächenmarker CD44, CD29 und CD90 (Vieira et al. 2010; Kisiel et al. 2012; Takemitsu et al. 2012) und CD117, CD73 sowie CD105 (Martinello et al. 2011; Kang et al. 2012). Eine Expression der Negativmarker CD34 und CD45 konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Martinello et al. 2011; Kang et al. 2012; Kisiel et al. 2012). Allerdings wurde der Stammzellmarker CD73, der in einigen Studien mit cASCs und auch in humanen ASCs exprimiert wurde, in der Studie von Vieira et al. nicht exprimiert, was an der unspezifischen Bindung der humanen Antikörper an die caninen Zellen liegen könnte (Vieira et al. 2010).

## 2.3 Therapeutische Anwendungsmöglichkeiten von Stammzellen in der Medizin

Der Einsatz von mesenchymalen Stammzellen in der regenerativen Medizin, vor allem Stammzellen aus dem Fettgewebe, ist aufgrund ihres großen Differenzierungspotenzials in verschiedene Gewebe sehr vielversprechend. So stellen Stammzellen einen großen Hoffnungsträger in der medizinischen Forschung dar. Laut Ohta et al. ist die Behandlung mit Stammzellen bei Rückenmarkstraumata eine der besten Therapiemöglichkeiten (Ohta et al. 2004). Stammzellen können zur Wiederherstellung funktionsgestörter Zellen, Gewebe und sogar Organe verwendet und so differenziert werden, dass sie ausgefallene oder geschwächte Funktionen eines Körpers ersetzen. Der potenzielle Einsatz von Stammzellen wird in mehreren Studien zur Therapie von Herzerkrankungen, Rückenmarkstraumata, Lungenfibrose und Knochen- und Knorpeldefekten in präklinischen Studien der Humanmedizin, aber auch in der Tiermedizin beschrieben (Fortier und Travis 2011).



Bei der Untersuchung zur Stammzelltherapie wird mit embryonalen sowie mesenchymalen Stammzellen geforscht. Allerdings sind die Erforschung und die Verwendung von embryonalen Stammzellen ethisch umstritten und beinhaltet zudem einige praktische Probleme. Die Gewinnung embryonaler Stammzellen erfordert oftmals die Zerstörung von Embryonen (Menschliche Stammzellen 2003). Außerdem kann das unkontrollierte Proliferations- und Differenzierungspotenzial der embryonalen Stammzellen zur Tumorentstehung führen (Sykova und Jendelova 2007). Eine Alternative für die Erforschung von Therapien in der regenerativen Medizin stellen damit die mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark oder dem Fettgewebe dar.

In der regenerativen Medizin kommen sowohl BMSCs als auch ASCs zum Einsatz. Stammzellen aus dem Fettgewebe haben einige Vorteile gegenüber Stammzellen aus dem Knochenmark. Sie sind zugänglicher und einfacher zu entnehmen als Zellen aus dem Knochenmark (Arnhold und Wenisch 2015). Außerdem ist Fettgewebe zellreicher als Knochenmark. Während die Häufigkeit von BMSCs in einer mit Ficoll isolierten Zellpopulation beim Menschen mit 0,01 bis 0,001% angegeben wird, beträgt die Häufigkeit bei humanen ASCs je nach Autor zwischen 2–30 % (Pittenger et al. 1999). Kitagawa et al. geben an, dass in 1 g Fettgewebe circa  $5 \times 10^3$  Stammzellen enthalten sind (Kitagawa et al. 2006). Dies sei eine 500x größere Menge, als in 1g Knochenmark (Fraser et al. 2006).

Für BMSCs des Hundes bestimmten Kadiyala et al. eine Häufigkeit von 0,004%, das heißt eine Stammzelle pro  $2,5 \times 10^4$  kernhaltigen, mittels eines Ficoll- Gradienten isolierten Zellen (Kadiyala et al. 1997). Eine Häufigkeitsangabe für die ASCs des Hundes ist bisher noch nicht bekannt.

Des Weiteren können ASCs schneller expandiert werden und auch nach einer längeren Zeit in Kultur und in hohen Passagen erhalten diese Zellen ihre Pluripotenz (Nakagami et al. 2006). Da es sich bei ASCs zudem um adulte Stammzellen handelt, stellt ihr Einsatz in der Medizin im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen keine ethischen und praktischen Probleme dar (Nohroudi et al. 2010). All das weist darauf hin, dass ASCs eine vielversprechende Quelle zur Behandlung und Therapie von akuten und chronischen Erkrankungen sein könnten.

### 2.3.1 Therapeutische Anwendung von caninen MSCs in der Medizin

Bevor medizinische Therapien und Behandlungen am Menschen getestet werden können, müssen Studien an zwei tierischen Modellen erfolgen: Zum Einen am Nagetiermodell, hierbei bevorzugt an Ratten, und zum Anderen an einem größeren Tiermodell, das in Bezug auf konkrete Erkrankungen oder Stoffwechseleigenschaften mehr Gemeinsamkeiten mit dem

Menschen aufweist (Borjesson und Peroni 2011). Ähnlichkeiten im Bezug auf die Anatomie, die Pathogenese und die athletische Leistungsfähigkeit machen den Hund zu einem attraktiven Modellorganismus für die Erforschung der Stammzelltherapie beim Menschen (Chu et al. 2010). Ein Beispiel für eine Anwendung am Menschen, die vorher im Hundemodell untersucht wurde, ist eine Studie über die Transplantation caniner MSCs zur Regeneration des Myokardgewebes und der daraus resultierenden funktionalen Verbesserung des Myokardfunktion (Stamm et al. 2003).

Erkenntnisse und Ergebnisse, die anhand eines Hundemodells gewonnen werden, lassen sich jedoch nicht nur auf den Menschen übertragen, sondern finden selbst Einsatz in der Tiermedizin. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Transplantation von ASCs zur Verbesserung von Osteoarthritis in erkrankten Hunden führt (Black et al. 2007).

Li et al. gelang es ebenfalls, ASCs zur Knochenregeneration in ein Hundemodell zu transplantieren (Li et al. 2014). Des Weiteren wurde der Einsatz von MSCs bei Verletzungen des zentralen Nervensystems beim Hund untersucht (Jung et al. 2009; Ryu et al. 2009).

Da neuronale Erkrankungen in der regenerativen Medizin eine große Rolle spielen und das Hauptaugenmerk dieser Arbeit auf der neuronalen Differenzierung von caninen MSCs liegt, wird im folgenden näher auf den Einsatz von Stammzellen in neuronalen Erkrankungen eingegangen.

### 2.3.2 Einsatz von Stammzellen bei neurologischen Erkrankungen

Verletzungen, Schädigungen und Erkrankungen des zentralen Nervensystems sind oft schwerwiegend und können meist nur unzureichend behandelt werden. Medikamentöse Behandlungen oder operative Maßnahmen sind kaum dazu in der Lage, den Verlust von Nervenzellen zu kompensieren oder defekte Nervenzellen zu erneuern. Aufgrund dessen liegt ein großer Schwerpunkt der medizinischen Forschung auf den Therapiemöglichkeiten zum Einsatz von Stammzellen gegen neurologische Krankheitsbilder (Maltman et al. 2011). Dabei ist der Einsatz von Stammzellen vielfältig. Sie finden Anwendung bei Gehirnfarkten, neurodegenerativen Erkrankungen sowie bei Gehirn- und Rückenmarkstraumata (Wu et al. 2003; Mazzini et al. 2006). Voraussetzung für die Verwendung von Stammzellen beim Menschen ist die Erforschung dieser Zellen und deren Effekten innerhalb präklinischer Studien in Tiermodellen (Hiyama et al. 2008). Bei der Stammzelltherapie im neurologischen Bereich werden entweder neurale Stammzellen, vor allem aber Stammzellen aus dem Knochenmark oder Fettgewebe verwendet, die zuvor durch Zugabe verschiedener Faktoren neuronal differenziert werden.

### 2.3.3 Einsatz von neuronalen Stammzellen

Bislang gibt es mehrere Studien, in denen die Transplantation neuraler Stammzellen (englisch: neural stem cells, NSCs) in ein neurologisch erkranktes Versuchstier untersucht wurde (Svendsen et al. 1996; Studer et al. 1998; Ogawa et al. 2002). Viele Untersuchungen gehen auf den Einsatz fetaler neuraler Stammzellen zurück. So konnte gezeigt werden, dass die Transplantation von fetalen NSCs zu einer Linderung der Parkinsonschen Krankheit führen kann (Brundin et al. 1988; Brundin und Bjorklund 1998). Der Einsatz fetaler Stammzellen ist jedoch praktisch und ethisch stark umstritten und somit sind Therapiemöglichkeiten auf dieser Ebene limitiert und eingeschränkt. Um diese Probleme zu umgehen, wurde versucht adulte neurale Stammzellen zu transplantieren. Ogawa et al. gelang es nach *in vitro* Expansion, eine Rückenmarkserkrankung in einem Rattenmodell mithilfe adulter NSCs zu reparieren (Ogawa et al. 2002). Fünf Wochen nach der Transplantation war die Bewegungsfähigkeit der Vorderbeine der Tiere wieder hergestellt. Diese Studie zeigt, dass die transplantierten Zellen neue Nervenzellen generieren, welche sich in den Ort der Verletzung integrieren und die Funktion der zerstörten Nervenzellen übernehmen. In weiteren Studien konnte ebenfalls belegt werden, dass die Rück-Transplantation neuraler Stammzellen in verschiedene Bereiche des Gehirns von Ratten oder Mäusen in einer Differenzierung in Neurone oder Gliazellen und in einer Expression verschiedener Markergene resultiert (Gage et al. 1995; Svendsen et al. 1996; Flax et al. 1998).

### 2.3.4 Einsatz von mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark und Fettgewebe zur neuronalen Differenzierung

Die Unzugänglichkeit der NSC-Quellen limitiert den klinischen Gebrauch dieser Zellen (Woodbury et al. 2000). Neben der Anwendung von neuronalen Stammzellen zur Behandlung neurologischer Erkrankungen werden daher auch mesenchymale Stammzellen, wie Stammzellen aus dem Knochenmark und dem Fettgewebe, verwendet. Diese Zellen müssen vor der Transplantation *in vitro* in eine neuronale Richtung differenziert werden. So konnte Woodbury et al. zeigen, dass sich humane und murine BMSCs neuronal differenzieren lassen (Woodbury et al. 2000). Auch Sanchez-Ramos et al. gelang dieser Nachweis (Sanchez-Ramos et al. 2000). Kopen et al. injizierte MSCs in die Seitenventrikel des Gehirns neonataler Mäuse. Diese Zellen differenzierten sich zu Astrozyten und Neurofilament-reichen Zellen (Kopen et al. 1999). Bei Ratten konnten durch eine kontrolliert herbeigeführte Rückenmarksläsion Stammzellen aus dem Knochenmark in den vierten Ventrikel

transplantiert werden (Ohta et al. 2004). Dies führte zu einer verbesserten Motorik der Tiere. Allerdings konnte keine Differenzierung der BMSCs in Neuronen oder Gliazellen nachgewiesen werden. Ohta et al. nahmen an, dass MSCs die Regeneration des Rückenmarks durch die Bildung trophischer Mediatoren positiv beeinflussen können (Ohta et al. 2004). Bei Versuchen mit Hunden und Katzen, die an Bandscheibenvorfällen und Wirbelfrakturen litten und keine Tiefensensibilität zeigten, konnte durch den intrathekalen Einsatz von BMSCs die Tiefensensibilität innerhalb weniger Tage um 90% verbessert werden (Erb et al. 2011).

Ryu et al. transplantierten cASCs in Hunde mit Rückenmarktraumata. Anhand der Funktionalität der Gliedmaßen, des Expressionsnachweises neuraler Marker und histologischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die injizierten ASCs die defekten Nervenzellen ersetzten und sich in Neurone und Gliazellen differenzierten (Ryu et al. 2009).

## 2.4 Neuronale Differenzierung mesenchymaler Stammzellen

*In vitro* können neuronale Vorläuferzellen und funktionelle postmitotische Neurone aus embryonalen Stammzellen (Okabe et al. 1996) oder aus Stammzellen des embryonalen (Tropepe et al. 1999) und adulten ZNS (Gage 2000; Rao 1999) gewonnen werden.

Die Fähigkeit der neuronalen Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen wurde bislang an Zellen aus dem Knochenmark und an Zellen aus dem Fettgewebe von unterschiedlichen Spezies untersucht. Bei Versuchen zur neuronalen Differenzierung von humanen Knochenmarksstammzellen fanden Wenisch et al. heraus, dass die differenzierten Zellen eine neuronale Morphologie aufweisen. Des Weiteren exprimieren diese Zellen die Neuronen-spezifischen Marker  $\beta$ -III-Tubulin und Enolase (Wenisch et al. 2006). Diese Erkenntnisse sind deckungsgleich mit den Ergebnissen von Long et al., die ebenfalls humane Knochenmarksstammzellen in eine neuronale Richtung differenzierten. Auch hier veränderten die Zellen ihre Morphologie im Laufe der Differenzierung und wurden positiv auf die Expression der Marker Nestin und  $\beta$ -III-Tubulin getestet (Long et al. 2005). Woodbury et al. gelang die neuronale Differenzierung ebenso an humanen, aber auch an murinen adulten Knochenmarksstammzellen. Der Phänotyp dieser Zellen zeigte durch die Differenzierung eine neuronale Morphologie mit langen Ausläufern, Wachstumshügeln und Filopodien (Woodbury et al. 2000). Auch Brazelton et al. und Mezey et al. gelang es, BMSCs in das Gehirn von Mäusen zu injizieren und damit eine neuronale Differenzierung der Zellen zu erreichen, die Expressionen neuronaler Marker zeigten (Brazelton et al. 2000; Mezey et al. 2000).

Auch bei der Untersuchung von Fettgewebstammzellen lassen sich durch eine neuronale Differenzierung Veränderungen zwischen undifferenzierten und differenzierten Zellen feststellen. Safford et al. konnten an humanen und murinen Fettgewebstammzellen einen neuronalen Phänotyp sowie anhand einer Immunofluoreszenz eine Expression von GFAP und Nestin nachweisen. Weiterhin zeigten die Zellen durch einen Western Blot eine Proteinexpression derselben Marker (Safford et al. 2002).

#### 2.4.1 Neuronale Differenzierung caniner mesenchymaler Stammzellen

Versuchshunde werden in den letzten Jahren immer häufiger als Modell für die Erforschung humaner neurologischer Erkrankungen genutzt. Es gibt einige Studien zur neuronalen Differenzierung caniner Knochenmarksstammzellen. Kamishina et al. gelang die neuronale Differenzierung von Knochenmarksstammzellen mit dem Ergebnis, dass diese Zellen eine neuronale Morphologie und eine Expression der Marker GFAP und  $\beta$ -III-Tubulin zeigten (Kamishina et al. 2006). Ebenfalls untersuchten Edamura et al. die Differenzierung an caninen BMSCs. Anhand von rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen konnten verschiedene Mikrostrukturen neuronal differenzierter Zellen nachgewiesen werden, wie Wachstumshügel und Intermediärfilamente (Edamura et al. 2012). Canine Stammzellen aus dem Nabelschnurblut sind ebenfalls zu einer Differenzierung in die neuronale Richtung fähig (Kim et al. 2014). Diese differenzierten Zellen zeigten neben einem neuronalem Phänotyp auch eine mRNA-Expression des frühen Neuronenmarkers  $\beta$ -III-Tubulin und eine Proteinexpression von Nestin und  $\beta$ -III-Tubulin.

Die Erforschung der neuronalen Differenzierung von cASCs ist bislang kaum untersucht. Es existiert eine Vergleichsstudie, die sich mit der Ausbildung von Neurosphären bei BMSCs und ASCs beschäftigt (Takemitsu et al. 2012). Diese Studie konnte zeigen, dass canine BMSCs und ASCs in Neurosphären und Neuronen-ähnliche Zellen differenziert werden können (Takemitsu et al. 2012).

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Verwendete Chemikalien und Reagenzien für die Zellkultur

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
Ascorbinsäure-2-phosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
$\beta$ -Glycerolphosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bovines Serumalbumin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Butylhydroxyanisol (BHA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium low glucose (DMEM)	Gibco® Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Dexamethason	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Forskolin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Fötales Kälberserum (FKS)	Gibco® Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Hydrocortison	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Insulin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Insulin-Transferrin-Selenium (ITS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Kaliumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumpyruvat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
PBS, phosphate buffered saline	Gibco® Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Rabbit serum	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Rosiglitazon	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
TGF- $\beta$	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
TriplE	Gibco® Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Valproinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

### 3.1.2 Verwendete Chemikalien und Reagenzien für histologische Färbungen

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
Aquapolymount	Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, Deutschland
Alcianblau 8GX	Chroma Gesellschaft Schmid GmbH%Co., Stuttgart
Alizarinrot S	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Coomassie	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Instant Hematoxylin	Thermo Fischer Scientific, USA
HEPES	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Höchstfarbstoff	Invitrogen, Eugene, Oregon, USA
Kaiser Gelatine	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kernechtrot	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magensiumchlorid-Hexahydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Oil Red O	Chroma Gesellschaft Schmid und Co., Stuttgart, Untertürkheim, Deutschland
Paraffin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Paraformaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
PBS, phosphate buffered saline	Gibco® Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Saccharose	Merck, Darmstadt, Deutschland
Silbernitrat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X	Calbiochem GmbH, Bad Soden, Deutschland
Phalloidin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Xylol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

### 3.1.3 Verwendete Reagenzien für molekularbiologische Untersuchungen

Reagenz	Hersteller
Acrylamid	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Agarose	Bioline, Luckenwalde, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
BioTherm™ 10x PCR Puffer	Ares Bioscience, Köln, Deutschland
BioTherm™ Taq Polymerase	Ares Bioscience, Köln, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
ColorPlus™ Prestained Protein Ladder, Broad Range (10-230 kDa)	BioLabs, Massachusetts, USA
DNAse I	Roche, Mannheim, Deutschland
DNAse I Incubation buffer	Roche, Mannheim, Deutschland
DNA Loading Buffer 5x	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
dNTP Mix	Applied Biosystems, Kalifornien, USA
EDTA	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure (Eisessig) 100%	Merck, Darmstadt, Deutschland



Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Gel Green <sup>TM</sup> Nucleic Acidic Stain	Biotium, über VWR, Darmstadt, Deutschland
GeneAmp <sup>®</sup> Gold RNA PCR Core Kit	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Glycerin (98%)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
GoTaq <sup>®</sup> qPCR Master Mix	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
HyClone <sup>®</sup> H <sub>2</sub> O	Perbio Science, Bonn, Deutschland
Harnstoff	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid (BioTherm <sup>TM</sup> )	Ares Bioscience, Köln, Deutschland
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
PBS, phosphate buffered saline	Gibco <sup>®</sup> Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
peqGOLD TriFast <sup>TM</sup> Reagent	PEQLAB, Erlangen, Deutschland
Pierce <sup>®</sup> ECL Western Blotting Substrate	Thermo Fischer Scientific, USA
Ponceau Stain	Amresco, Solon, Ohio, USA
Quantitas DNA Marker 50bp - 2 kb	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
QuantiTect Primer Assay	Qiagen, Hilden, Deutschland
Random Hexamers	Invitrogen, Eugene, Oregon, USA
RNA Lysis Puffer	Analytik Jena, Jena, Deutschland
RNAse-Inhibitor	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TEMED-Puffer	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Tetenal Dokumol	Tetenal Europe, Norderstedt, Deutschland
Tetenal Superfix Plus	Tetenal Europe, Norderstedt, Deutschland
Tris-Base	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween <sup>®</sup> 20	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

### 3.1.4 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Gerät/Material	Hersteller
24-Well Zellkulturplatten	Deutschland
96-Well Platten für qRT-PCR	BioRad, München, Deutschland
Autoclav „Systec DE-65“	Systec, Wettenberg, Deutschland
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
CFX96 Touch™ Real-Time-PCR	BioRad, München, Deutschland
Deckgläser 13 mm	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Detection system	Nalgene R über Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Cryo-Einfriergerät „Mr. Frosty“	
Einbett-Automat „EG1160“	Leica, Solms, Deutschland
Falcon Zentrifugenröhrchen 50 ml, 15 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Feinwaage „PB 3002-S Delta Range“	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Feinwaage „Discovery“	Ohaus, Nänikon, Schweiz
Fluoreszenzmikroskop Axio Observer.2.1	Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland
Freezing Gefäß „Mr. Frosty“	NALGENE®Labware, Thermo Fischer Scientific, Roskilde, Dänemark
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Gefrierschrank -86°C Heraeus Herafreeze	Thermo Fischer Scientific, USA
Gelelektrophoresekammer	Biometra, Göttingen, Deutschland
Glaspipetten	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Hard-Shell® PCR Platten 96 well	BioRad, München, Deutschland
Inkubator „Hera cell 150“	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
Kamera Leica MC170HD	Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Deutschland

Kanüle 14G	Braun, Melsungen, Deutschland
Kryoröhrchen 1,5 ml	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Küvette	Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Leica Kamera	Leica Camera AG, Wetzlar, Deutschland
LI-COR "Odyssey"	LI-COR Biosciences, Nebraska, USA
Magnetrührer „IkaMAG RET“	Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland
Messzylinder aus Glas	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Microseal® B Film PCR Sealer	BioRad, München, Deutschland
Mikroskop Axiophot	Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland
Mikroskop Leica DMIL	Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Deutschland
Mikrotom „SM 2000 R“	Leica, Solms, Deutschland
Mikrowelle 8520	Privileg, Stuttgart, Deutschland
Mini PAGE Elektroblothing-System, shiroGEL	VWR, Darmstadt, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Nitril-Einmalhandschuhe, rotiprotect®-Nitril	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Objektträger	R.Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
PAP-Pen	DCS Innovative Diagnostik Systeme, Hamburg, Deutschland
PCR SingleCap 8er-SoftStripes 0,1 ml	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
pH-Elektrode „SenTix41“	WTW, Weilheim, Deutschland
Photometer	Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Pipetten	Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettus	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland

Power Pac™ Basic	BioRad, München, Deutschland
Reaktionsgefäße 650 µl, 1,5 ml; 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Röhrchengestelle	Brand GmbH+Co.KG, Wertheim, Deutschland
Röntgenfilm, Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare Limited, Buckinghamshire, Großbritannien
Röntgenkassette Fujifilm EC-D	Fujifilm Europe GmbH, Italien
Schüttler IKA MTS2	IKA® Werke, Staufen, Deutschland
Sterilbank Zellkultur „MSC advantage“	Thermo Fischer Scientific, USA
Sterilisator-Ofen Heraeus	Heraeus, Hanau, Deutschland
Stickstofftank Thermolyne	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
Thermocycler „BIOER Life Eco“	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Transilluminator UVsolo	Biometra, Göttingen, Deutschland
Vortexer	IKA® Werke, Staufen, Deutschland
Wasserbad Labor	MEMMERT GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Wasserbad Zellkultur	Gesellschaft für Laborgeräte, Burgwedel, Deutschland
Zellkulturflaschen 75 cm <sup>2</sup>	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturschalen 6-Well, 24-Well	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Zentrifuge „Megafuge 11R Heraeus“	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
Zentrifuge „Micro 20“	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge „Micro 220R“	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

### 3.1.5 Software

Anwendung	Hersteller
Axiovision image analysis	Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland
BioRad CFX Manager Software	BioRad, München, Deutschland
Citavi 5	Swiss Academic Software GmbH, Schweiz
Image Studio™ Software für „Odyssey®“	LI-COR Biosciences, Nebraska, USA
Microsoft Office Excel 2007	Microsoft Corporation, USA

### 3.1.6 Probenmaterial

Für die Untersuchung der neuronalen Differenzierung wurden mesenchymale Stammzellen aus dem Fettgewebe von Hunden isoliert. Dafür wurde intraabdominales Fettgewebe von neun Hunden (n=9) im Zuge einer Abdomenchirurgie gewonnen, welches für eine verbesserte Übersicht im Operationssaal entfernt wurde und andernfalls verworfen worden wäre. Die Operationen fanden in der Abteilung Chirurgie – Klinik für Kleintiere der Justus-Liebig-Universität Gießen statt. Die Hunde waren jünger als zwei Jahre, verschiedener Rassen sowie unterschiedlichen Geschlechts und Gewichts. Das Hirngewebe stammte von einem acht Wochen alten Border Collie, der aufgrund einer Erkrankung euthanisiert wurde. Proben von tumor erkrankten Hunden wurden ausgeschlossen. Das Fettgewebe wurde in sterile PBS-Lösung überführt und zur Zellisolierung in das Zellkulturlabor gebracht.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellkultur

#### 3.2.1.1 Isolierung von mesenchymalen Stammzellen aus Fettgewebe

Um die mesenchymalen Stammzellen aus dem Fettgewebe zu isolieren, wurden die Fettgewebeproben unter der Sterilbank des Zellkulturlabors mithilfe eines Skalpells in kleine Stücke zerschnitten und in ein 50 ml Falcon mit 20 ml sterilem PBS überführt. Anschließend wurden die Gewebestücke mit frischem PBS gewaschen. Dieser Schritt erfolgte zweimal, um Erythrozyten aus der Probe zu entfernen. Zur Durchführung der weiteren Schritte wurde eine Verdauungslösung wie folgt hergestellt: 1 mg/ml Collagenase I und 10 mg/ml Bovines Serum Albumin (BSA) wurden in 1 ml PBS pro 1 ml Fettgewebe gelöst. Die Verdauungslösung wurde mit dem Fettgewebe im Wasserbad für 10 Minuten erwärmt und anschließend 30-45 Minuten auf einem Rüttler bei 37°C im Brutschrank inkubiert, bis die Lösung eine weitgehend homogene Konsistenz angenommen hatte. Nach Zentrifugation für 5 Minuten bei 800 rpm bildete sich am Boden des Falcons ein Zellpellet mit einem trüben Überstand. Die nun vorliegenden extrahierten Zellen wurden abpipettiert und mithilfe eines 70 µl Filters in ein neues 50 ml Falcon überführt. Die anschließenden Waschschrte mit je 20 ml PBS wurden zweimal wiederholt und das Falcon wurde bei 800 rpm für je 5 Minuten zentrifugiert. Daraufhin wurden die extrahierten Zellen in einem Milliliter Kultivierungsmedium, bestehend aus Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) mit 10% FBS Superior und 1% Penicillin/Streptomycin (P/S), suspendiert und je nach Zellzahl in Zellkulturflaschen mit Kultivierungsmedium ausplattiert.

**Tabelle 1:** Zusammensetzung des Kultivierungsmediums (50 ml).

Komponente	Ist-Konzentration	Soll-Konzentration	Menge
DMEM 1g/l Glucose			44,5 ml
P/S	100%	1%	0,5 ml
FBS	100%	10%	5 ml

### 3.2.1.2 Kultivierung und Subkultivierung von mesenchymalen Stammzellen

Die Kultivierung der mesenchymalen Stammzellen erfolgte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank. Ein Medienwechsel erfolgte alle 3 bis 4 Tage. Frisch isolierte Stammzellen wurden mit der Bezeichnung „Passage 0“ benannt. Die Zellen wurden mit Kultivierungsmedium im Brutschrank kultiviert, bis sie auf dem Boden der Zellflasche eine Konfluenz von circa 80% erreicht hatten. Zu diesem Zeitpunkt mussten die Zellen passagiert werden. Grund dafür ist die Tatsache, dass der in der Zellkulturflasche zur Verfügung stehende Platz durch stetige Zellteilung abnimmt. Dies führt zu einer Kontaktinhibition und zu einer Abnahme der Proliferation. Außerdem neigen Stammzellen dazu, in hoher Dichte zu differenzieren. Um dies zu vermeiden, wurden die Zellen aus den alten Zellkulturflaschen abgelöst und die Kultur auf mehrere andere Kulturgefäße verteilt. Hierbei wurde altes Medium aus der Kulturflasche entfernt und die Zellen mit PBS durch leichtes Schwenken gewaschen, um tote oder abgelöste Zellen zu entfernen. Nach Absaugen des PBS erfolgte eine Inkubation der Zellen mit 5 ml des Enzyms TrypLE für 7 Minuten bei 37°C im Brutschrank. Das Enzym diente dazu, die angewachsenen Zellen vom Plastik der Kulturflasche und von anderen Zellen zu trennen. Nach dieser Inkubation wurden die Zellen lichtmikroskopisch untersucht. Bei erfolgreicher Trennung der Zellen konnten nun frei schwimmende Zellen im Medium beobachtet werden. Im folgenden Schritt wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 5 ml des Kultivierungsmediums gestoppt. Das Medium-Enzym-Gemisch wurde in der Kulturflasche mehrmals auf- und abpipettiert, um noch eventuell festsitzende Zellen zu lösen. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Falcon überführt und bei 800g für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit über dem entstandenen Zellpellet am Falconboden vorsichtig abpipettiert und verworfen ohne das Zellpellet zu zerstören. Das Pellet wurde mit 1 ml frischem Kultivierungsmedium resuspendiert. Daraufhin konnte die Zellzahl in einer Neubauer Zählkammer bestimmt werden. Es wurde die Zellzahl pro Milliliter Medium berechnet. Von der resuspendierten Lösung wurden circa 10 µl in eine Zählkammer gebracht. Die Zählkammer besteht aus 4 großen Quadraten, die wiederum jeweils aus 16 kleinen Quadraten bestehen. Für die Zellzählung wurden 2 große Quadrate ausgezählt. Daraufhin erfolgte die Bestimmung eines Mittelwerts der Zellen. Die Zellzahl pro 1 ml wurde anhand der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Mittelwert} \times 10^4 = \text{Zellen/ml}$$

Die Zellen wurden nun entweder mit einer Dichte von 10 000 bis 15 000 Zellen/cm<sup>2</sup> mit 10-12 ml Basismedium in einer großen Zellkulturflasche ausgesät und weiterhin im Brutschrank inkubiert oder in einer definierten Anzahl für Versuche verwendet.

### 3.2.1.3 Kryokonservierung von MSCs

Die Einlagerung in flüssigem Stickstoff diente der Lagerung der Zellen, die nicht für aktuelle Versuche gebraucht wurden oder die nicht weiter proliferieren sollten. Hierfür wurden Zellen, die eine 80%ige Konfluenz erreicht hatten, wie oben beschrieben abgelöst und mit einer Dichte von  $1-3 \times 10^6$  Zellen pro Milliliter in einem 1,5 ml Kryoröhrchen mit einem speziellen Einfriermedium überführt. Daraufhin wurden die Zellen für 24 Stunden in einem Cryo 1°C Freezing Container „Mr. Frosty“ bei -80°C gelagert. Dies ermöglichte eine kontinuierliche Temperaturabnahme zum Schutz vor Gefrierschäden. Anschließend konnten die Röhrchen bei -196°C in flüssigem Stickstoff bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

Einfriermedium:

Für 100 ml Einfriermedium 65 ml Medium mit 30 ml FBS und 5 ml DMSO vermischen.

### 3.2.1.4 Auftauen von MSCs

Die eingefrorenen mesenchymalen Stammzellen wurden bei Bedarf aus dem Stickstoff entnommen und für 45 Sekunden im 37°C warmen Wasserbad angetaut. Danach wurden sie unter der Sterilbank weiter aufgetaut und in ein 15 ml Falcon mit 5 ml Kultivierungsmedium pipettiert. Anschließend wurden sie für 5 min bei 800 rpm zentrifugiert. Ohne das Zellpellet zu zerstören, wurde der flüssige Überstand abgenommen. Die Zellen wurden mit 1 ml frischem Medium resuspendiert und anschließend in einer Zellzahl von 500.000 Zellen in eine 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche mit 10-12 ml Medium ausplattiert. Nach circa 7 Tagen konnte lichtmikroskopisch eine Konfluenz der Zellen von 80% festgestellt werden. Daraufhin wurden die Zellen entweder nochmals passagiert und erneut ausplattiert, falls eine höhere Passage erreicht werden sollte, oder abgelöst und für Versuche verwendet.

### 3.2.1.5 Untersuchung der Multipotenz der caninen Fettgewebstammzellen

Um die Multipotenz der aus dem caninen Fettgewebe isolierten Zellen zu zeigen und zu überprüfen, wurden die Zellen einer adipogenen, chondrogenen und osteogenen Differenzierung unterzogen. In den jeweiligen Kontrollgruppen (Negativkontrollen) wurden die Zellen nicht mit Differenzierungsmedium, sondern mit normalem Kultivierungsmedium inkubiert.



### 3.2.1.5.1 Osteogene Differenzierung

Für die osteogene Differenzierung wurden die Zellen in einer Dichte von 15000 Zellen/cm<sup>2</sup> in einer 24 Wellplatte auf 13 mm Ø Glasplättchen ausplattiert und anschließend mit in Tabelle 2 aufgeführtem Medium zur osteogenen Differenzierung induziert.

**Tabelle 2:** Zusammensetzung des osteogenen Differenzierungsmediums (10 ml).

Komponente	Ist-Konzentration	Soll-Konzentration	Menge
DMEM 1g/l Glucose			9400 µl
P/S	100%	1%	100 µl
FBS	100%	5%	500 µl
Ascorbinsäure	100 mM	60 µM	6 µl
Dexamethason	1 mM	0,1 µM	1 µl
β-Glycerolphosphat	1 M	10 mM	100 µl

Zusätzlich zu dem angesetzten osteogenen Medium wurden in zwei Ansätzen 5 mM und 7,5 mM Calciumchlorid (CaCl<sub>2</sub>) hinzugegeben. Die osteogene Differenzierung wurde für die Dauer von 21 Tagen durchgeführt. Ein Medienwechsel erfolgte alle 3 Tage.

Zur Auswertung der differenzierten Zellen diente im Anschluss an die Differenzierung die Alizarinrot-Färbung.

### 3.2.1.5.2 Adipogene Differenzierung

Für die adipogene Differenzierung wurden die Zellen in einer Dichte von 15000 Zellen/cm<sup>2</sup> in einer 24 Wellplatte auf Deckgläschen (13 mm Ø) ausplattiert.

Die Stammzellen wurden für 21 Tage mit adipogenem Differenzierungsmedium inkubiert. Ein Medienwechsel erfolgte alle 3 Tage.

**Tabelle 3:** Zusammensetzung des adipogenen Differenzierungsmediums (10 ml).

Komponente	Ist-Konzentration	Soll-Konzentration	Menge
DMEM 4,5 g/l Glucose			9500 µl
P/S	100%	1%	100 µl
Rabbit Serum	100%	5%	500 µl
Dexamethason	1 mM	1 µM	10 µl
100xITS	200x	5 µg/ml	50 µl
Rosiglitazon		5 µM	10 µl

Anschließend an die Differenzierung wurden die Zellen mit der Oil Red O-Färbung gefärbt.

### 3.2.1.5.3 Chondrogene Differenzierung

#### 3.2.1.5.3.1 Anlegen von Pelletkulturen

Zum Erstellen von dreidimensionalen Pelletkulturen wurden die kultivierten Zellen wie oben beschrieben aus Zellkulturflaschen mittels TriplE abgelöst und gezählt. Anschließend wurden je  $1,5 \times 10^5$  bis  $2 \times 10^5$  Zellen in Kultivierungsmedium in sterile 1,5 ml Eppendorfgefäße pipettiert und bei 120g für 5 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation hatte sich ein Zellpellet am Boden der Eppendorfgefäße gebildet. Mittels einer 14G Kanüle wurden mehrere Löcher in den Deckel der Eppendorfgefäße gestochen, um einen Gasaustausch im Brutschrank zu ermöglichen. Die Zellen wurden daraufhin für 24 Stunden im Brutschrank kultiviert. Aus dem zentrifugierten Pellet bildete sich daraufhin ein dreidimensionales Pellet. Die Pellets wurden im nächsten Schritt in eine 24 Well-Suspensionsplatte überführt.

Positivkontrollen wurden ab dem Start der Differenzierung mit chondrogenem Differenzierungsmedium kultiviert, während Negativkontrollen Kultivierungsmedium erhielten. Die Pellets wurden mit 500 µl des entsprechenden Mediums im Brutschrank für 21 Tage inkubiert. Ein Medienwechsel erfolgte hierbei alle 3 Tage.

**Tabelle 4:** Zusammensetzung des chondrogenen Differenzierungsmediums (10 ml).

Komponente	Ist-Konzentration	Soll-Konzentration	Menge
DMEM 1 g/l Glucose			8737 µl
FBS	100%	10%	1000 µl
P/S	100%	1%	100 µl
Ascorbinsäure	5 mM	50 µg/ml	500 µl
Insulin	10 µg/ml	62,5 µl	62,5 µl
TGF-β1	1 µg/ml		5 µl auf 495 µl Medium

Das Medium wurde für eine Woche angesetzt. TGFβ1 wurde dem Differenzierungsmedium aufgrund seiner kurzen Haltbarkeit immer erst während des Medienwechsels hinzugegeben.

#### 3.2.1.5.3.2 Fixation und Vorbereitung der Pellets

Die Pellets wurden nach Absaugen des Mediums zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurden sie für die Paraffin-Einbettung vorbereitet. Hierzu wurden die Pellets einzeln in PCR-Tubes umgesetzt und mit circa 500 µl 4%igem Paraformaldehyd für eine halbe Stunde fixiert. Nach Abpipettieren des PFA wurden die Pellets mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 90% und 100%) für je 30 Minuten entwässert. Es folgte eine zweimalige Inkubation mit Xylol für 30 Minuten. Anschließend konnten die Pellets in Bleiwännchen umgesetzt werden. Um Paraffinblöckchen herzustellen, wurden die Pellets in den Bleiwännchen mit warmem Paraffin übergossen und nach dem Erkalten ausgebettet.

Um die Pellets histologisch zu untersuchen, wurden Paraffinschnitte angefertigt. Hierzu wurden die Blöckchen in ein Schlittenmikrotom eingespannt. Für die Färbungen sollten möglichst Schnitte aus der Pelletmitte dienen. Es wurden Schnitte von je 4-6 µm Dicke hergestellt, die dann im 50°C warmen Wasserbad gestreckt und auf SuperFrost Plus Objektträger aufgezogen wurden. Die Schnitte wurden über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank getrocknet und anschließend entparaffiniert und rehydriert. Dafür wurden sie zweimal für je 10 Minuten in Xylol und dann für je 3 Minuten in einer absteigenden

Alkoholreihe (100%, 90%, 70%) inkubiert. Die Schnitte wurden einmal kurz mit Aqua bidest. gewaschen und konnten nun für die Alzianblau-Färbung verwendet werden.

### 3.2.1.6 Neuronale Differenzierung

Die neuronale Differenzierung wurde für die vorliegende Arbeit zu drei verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Die Auswirkungen der Differenzierung auf die cMSCs wurden nach 3, 24 und 72 Stunden morphologisch, immunhistologisch und molekularbiologisch analysiert. Diese Untersuchungen erfolgten mit Zellen der Passage 3.

Für die neuronale Differenzierung wurden die Zellen wie oben beschrieben abgelöst und in einer Neubauer Zählkammer gezählt. Die Zellen wurden in einer Anzahl von 20.000 Zellen/cm<sup>2</sup> in einer 24-Wellplatte zunächst für 1 Tag in 1 ml Kultivierungsmedium ausplattiert. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank.

Anschließend wurde das Medium entfernt und 500 µl frisch angesetztes, neuronales Differenzierungsmedium auf die Zellen pipettiert. Auch hier erfolgte die Inkubation und die Differenzierung der Zellen wie oben beschrieben im Brutschrank.

Nach 3, 24 und 72 Stunden Differenzierung wurde die Morphologie der Zellen lichtmikroskopisch untersucht, die Zellen für die Immunzytochemie bearbeitet und die RNA der Zellen für die molekularbiologischen Untersuchungen extrahiert.

**Tabelle 5:** Zusammensetzung des neuronalen Differenzierungsmediums (10 ml).

Komponente	Menge	Konzentration
DMEM	9760 µl	
P/S	100 µl	
Forskolin	20 µl	10 µM
Hydrocortison	2 µl	1 µM
Insulin	5 µl	5 µg/ml
Kaliumchlorid	100 µl	5 mM
Valproinsäure	3 µl	3 µM
Butylhydroxyanisol	10 µl	200 µM

### 3.2.2 Immunfluoreszenzfärbung für Zellen

Die Immunfluoreszenz ist eine biochemische Analysemethode und dient dem Nachweis von Antigenen in Zellen. An das zu untersuchende Antigen bindet ein Primärantikörper, an den in einem darauffolgenden Schritt ein Sekundärantikörper bindet, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Mit dieser Methode können Antigene markiert und sichtbar gemacht werden.

Nach Ablauf der neuronalen Differenzierungsdauer wurde zunächst das alte Basismedium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 4%iger PFA-Lösung für 30 Minuten fixiert. Anschließend wurden die Zellen erneut gewaschen und die Zellmembran für 15 Minuten mit einem Permeabilisierungspuffer permeabilisiert. Nach dreimaligem Waschen für je 5 Minuten der Zellen mit PBS erfolgte eine 30minütige Inkubation mit einem Blockierungspuffer, um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen bei 4°C über Nacht mit den primären Antikörpern inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Primärantikörper abgewaschen und es erfolgte die Inkubation mit den Sekundärantikörpern für 1 Stunde. Bei diesem und den folgenden Schritten mussten die Zellen abgedunkelt werden, da die Sekundärantikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt waren. Zur Darstellung der Zellkerne folgte anschließend eine Gegenfärbung mit dem Farbstoff Hoechst® Dye für 5 Minuten. Nach einem letzten Waschschrift wurden die Zellen mit Aquapolymount auf einem Objektträger eingedeckt.

Ansetzen der Lösung:

4% PFA

8 g Paraformaldehyd in 120 ml Aqua bidest lösen und mit 40 ml PBS Stammlösung auffüllen, pH 7,3 einstellen und auf 200 ml mit Aqua bidest auffüllen

Blockierungspuffer:

5% FKS wird mit 0,05% Triton X100 in PBS angesetzt

Permeabilisierungspuffer:

50 mM NaCl

3 mM MgCl<sub>2</sub>

300 mM Saccharose

20 mM HEPES

0,5 % Triton X100

werden in 100 ml PBS gelöst und auf pH 7 eingestellt

### 3.2.3 Immunfluoreszenzfärbung für Paraffinschnitte

Als Positivkontrolle für die neuronale Differenzierung und die Untersuchung neuronaler und glialer Marker sowie der Neurotrophine diente eine Gewebeprobe eines Hundehirns. Daraus wurde ein erbsengroßes Stück abgetrennt, anschließend paraffiniert und am Mikrotom geschnitten.

Die Paraffinschnitte für die immunhistochemische Untersuchung wurden anschließend zweimal für je 5 Minuten mit Xylol gewaschen, bevor sie, ebenfalls für je 5 Minuten, in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 90%, 70%) entparaffiniert und rehydriert wurden. Danach wurden die Schnitte mit Aqua bidest. gewaschen und getrocknet. Für die Immunfluoreszenzfärbung wurde mithilfe eines DabcoPap-Pens eine Markierung um den Gehirnschnitt gezogen, um die Lösungen gezielt auf die Probe pipettieren zu können. Alle weiteren Schritte erfolgten wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben.

Die weitere Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop. Hier wurden die Expressionsmuster der Proteine untersucht und digital festgehalten.

**Tabelle 6:** Verwendete Primärantikörper für die Immunfluoreszenzfärbung.

	<b>Spezies, Klonalität</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)	Maus, monoklonal	6,2 mg/ml	1:750	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Mouse anti- microtubules associated protein (MAP2)	Maus, monoklonal	0,5 mg/ml	1:100	Invitrogen, Life technologies, Kalifornien, USA
Mouse anti-A2B5	Maus, monoklonal	0,5 mg/ml	1:200	Invitrogen, Life technologies, Kalifornien, USA
Neuronal Class III β-Tubulin	Kaninchen, polyklonal	1 mg/ml	1:2000	Covance, Kalifornien, USA
Mouse anti-Nestin	Maus, monoklonal	250 µg/ml	1:500	BD Biosciences, Kalifornien, USA

**Tabelle 7:** *Verwendete Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenzfärbung.*

Sekundärantikörper	Verdünnung	Hersteller
Cy <sup>TM</sup> 3- conjugated AffiniPure Goat Anti-mouse IgG	1:200	Dianova, Hamburg, Deutschland
Cy <sup>TM</sup> 3- conjugated AffiniPure Goat-Anti-rabbit IgG	1:200	Dianova, Hamburg, Deutschland

**Tabelle 8:** *Verwendeter Zellkernfarbstoff für die Immunfluoreszenzfärbung*

Zellkernfarbstoff	Verdünnung	Hersteller
Hoechst Dye	1:5000	Sigma-Aldrich, Missouri, USA

### 3.2.4 Histologische Färbungen

#### 3.2.4.1 Alizarinrot S-Färbung

Zum Calciumnachweis in osteogen differenzierten Zellen dient die Alizarinrot-S-Färbung. Die gebildeten Calciumsalze werden hierbei intensiv rot-orange dargestellt.

Die differenzierten Zellen werden nach Ablauf der Differenzierungsdauer einmal für 3 Minuten mit PBS gewaschen und danach für 30 Minuten mit einer 4%igen PFA-Lösung fixiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen für je 3 Minuten mit Aqua bidest. folgte die Inkubation mit einer Alizarinrot-S-Lösung für 2-5 Minuten. Anschließend wurden die Zellen für 5x3 Minuten mit Aqua bidest. gewaschen und schließlich mit Kaiser` Gelatine eingedeckt.

Ansetzen der Lösung:

1% Alizarinrot-S:

0,5 g Alizarinrot-S + 45 ml Aqua dest. werden unter ständigem Rühren durch Zusatz von 5 ml einer 1:100 verdünnten 28%-33%igen Ammoniaklösung gelöst. Der pH-Wert wird evtl. durch weitere Zugabe der Ammoniaklösung auf 4,2 eingestellt.

### 3.2.4.2 Oil Red O-Färbung

Die Oil Red O-Färbung dient dem Nachweis von Fettvakuolen innerhalb der Zellen, die während der adipogenen Differenzierung entstehen. Diese werden durch Oil Red O rot gefärbt. Durch eine Gegenfärbung mit dem Farbstoff Hämatoxilin werden Zellkerne blau-violett, Kernkörperchen dunkelblau, Fettvakuolen rot und Zytoplasma blass blau-violett dargestellt.

Zunächst wurde das Differenzierungsmedium abgenommen und die Zellen wurden dreimal für je 1 Minute mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine Fixierung der Zellen für 30 Minuten mit einer 10%igen Formalinlösung. Während des Fixierungsschrittes wurde die Oil Red O-Gebrauchslösung frisch angesetzt. Nach der Fixierung wurden die Zellen mit Aqua dest. und danach für 5 Minuten mit 60%igem Isopropanol gewaschen. Dann erfolgte die Inkubation mit der Oil Red O-Färbelösung (Zusammensetzung siehe Anhang) für 10-20 Minuten im Dunkeln. Nach dem Färbeschritt wurden die Zellen wieder mit Aqua dest. gespült und anschließend mit Hämatoxilin nach Mayer für 1 Minute gegengefärbt. Es folgten mehrere Waschschrte mit warmem Leitungswasser, um den überflüssigen Farbstoff wieder herauszuwaschen. Nach einer letzten Spülung mit destilliertem Wasser konnten die Zellen mit Kaiser`Gelatine eingedeckelt werden.

Ansetzen der Lösungen:

Stammlösung (100 ml):

100 ml 99%iges Isopropanol auf 60°C erwärmen

0,3 g Oil Red O dazugeben

24 Stunden auf dem Rüttler stehen lassen

Lösung durch Faltenfilter filtrieren

Bei Raumtemperatur dunkel aufbewahren

Gebrauchslösung (5 ml):

3 ml frisch filtrierte Stammlösung mit

2 ml destilliertem Wasser vermischen

Die Lösung für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren

Lösung filtrieren



Hämatoxilin nach Mayer:

1000 ml Aqua dest.

1 g Hämatoxilin

200 mg Natriumjodat

50 g Kalialaun

50 g Chlorhydrat

1 g Zitronensäure

### 3.2.4.3 Alcianblau-Färbung

Zum Nachweis der chondrogenen Differenzierung diene die Alcianblau-Färbung. Mit ihrer Hilfe lassen sich saure und sulfatierte Mucopolysaccharide wie Hyaluronsäuren und Glycosaminoglycane nachweisen. Die sauren Mucopolysaccharide werden blau, Zellkerne rot und der Hintergrund rosa gefärbt.

Hierzu wurden die Objektträger in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 90%, 70%) abgespült und danach für 3 Minuten in 3%iger Essigsäure inkubiert. Die Präparate wurden daraufhin mit Alcianblau für 30 Minuten gefärbt. Danach folgten Spülungen der Objektträger mit destilliertem Wasser und einer Gegenfärbung mit Kernechtrot-Aluminiumsulfat für 5 Minuten. Zuletzt wurden die Präparate mit destilliertem Wasser gespült, entwässert (70%, 90%, 100%, Xylol) und mit Eukitt eingedeckt.

Ansetzen der Lösung:

0,5 g Alcianblau

1 ml Eisessig

100 ml Aqua dest.

Alle Komponenten miteinander vermischen, anschließend filtrieren.

### 3.2.5 Molekularbiologische Untersuchungen

#### 3.2.5.1 RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion erfolgte mithilfe des innuPrep RNA Mini Kits von Jena Analytik nach Angaben des Herstellers. Nach der Extraktion wurde die RNA in 20 µl RNase freiem Wasser gelöst und anschließend am BioPhotometer von Eppendorf bei 260 nm auf ihre Reinheit und ihren RNA-Gehalt überprüft. Die RNA-Proben konnten dann bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert werden.

#### 3.2.5.2 cDNA-Synthese und Reverse Transkriptase

Bei der Reversen-Transkriptions-Polymerasen-Kettenreaktion (RT-PCR) wird durch reverse Transkription die extrahierte mRNA in copy-DNA (cDNA) umgeschrieben. Um eine Verunreinigung der Proben mit genomischer DNA zu vermeiden, wurde zunächst ein DNase-Verdau durchgeführt. Hierfür wurde der in der Tabelle 9 dargestellte Mix verwendet. Zum Einsatz kamen 100 ng/ml RNA. Anschließend erfolgte eine Behandlung im Thermocycler DNA-Engine von Biorad nach folgendem Programm:

1. 25 Minuten bei 37°C
2. 5 Minuten bei 75°C
3. Abkühlen auf 4 °C

**Tabelle 9:** Mastermix DNase Verdau.

Kit/Hersteller	Reagenz	1x Ansatz
GeneAMP GoldRNA PCR Core Kit (Applied Biosystems)	25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,2 µl
Roche	10x DNase I incubation buffer	1,2 µl
Roche	10 U/µl DNase I, RNase frei	1,2 µl
GeneAMP GoldRNA PCR Core Kit (Applied Biosystems)	4 U/µl RNase Inhibitor	0,3 µl

Im Anschluss an den DNase-Verdau wurde die RNA in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurde der in der Tabelle 10 aufgeführte Mastermix verwendet. Als Startprimer für die Reverse Transkriptase wurden Random Hexamers genutzt, die aus zufällig zusammengesetzten Nukleotiden bestehen und sich der mRNA willkürlich anlagern können. Als Bausteine für die cDNA dienten Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs).

Die Proben wurde in 2 Ansätzen als „+RT“ und „-RT“ weiterverarbeitet. Für den „+RT“-Ansatz wurden 51 µl des RT-Mastermixes mit 9 µl der DNase behandelten RNA zusammenpipettiert. Hinzugefügt wurden hierbei ein RNase-Inhibitor und reverse Transkriptase. Im „-RT“-Ansatz wurde anstelle der reversen Transkriptase steriles, RNase freies Wasser hinzugegeben. Für diesen Ansatz wurden 8,5 µl des RT-Mastermixes mit 1,5 µl der RNA vermengt. Der „-RT“-Ansatz diente der Kontrolle des DNase Verdau und der Reinheit der RNA-Probe. Die beiden Ansätze wurden im Thermocycler wie folgt behandelt:

1. 8 Minuten bei 21°C
2. 15 Minuten bei 42°C
3. 5 Minuten bei 99°C
4. 5 Minuten bei 5°C
5. Abkühlen auf 4°C

**Tabelle 10:** Mastermix für die cDNA-Synthese

Kit/Hersteller	Reagenz	1x Ansatz
Biotherm	10x PCR Puffer mit MgCl <sub>2</sub>	300 µl
Biotherm	dNTPs	100 µl
Invitrogen	Random Hexamers	50 µl
HyClone®	H <sub>2</sub> O	300 µl

### 3.2.5.3 Qualitative Polymerase-Kettenreaktion

Bei der Polymerase-Kettenreaktion werden spezifische DNA-Abschnitte vervielfältigt, um sie anschließend mittels Gelelektrophorese sichtbar zu machen. An allen Proben wurde zur Überprüfung der synthetisierten cDNA und der Reinheit des „-RT“-Ansatzes eine qualitative PCR auf das Gen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) durchgeführt.

GAPDH ist ein Enzym der Glykolyse und somit in jeder Zelle detektierbar. Neben der GAPDH-PCR wurden auch die Expression der Oberflächenmarker CD90, CD105, CD14 und CD45 mittels der qualitativen PCR untersucht. In den Tabellen 11 und 12 sind die Nukleotidsequenzen des GAPDH-Primers sowie der Oberflächenmarker und die Bestandteile des PCR-Mastermixes aufgezeigt.

Je 10 µl des Mastermixes wurden mit je 2,5 µl der cDNA beziehungsweise mit den -RT-Proben gemischt. Alle Proben wurden anschließend mit folgendem Programm im Thermocycler inkubiert:

1. 5 Minuten bei 95°C
2. 30 Sekunden bei 94°C
3. 30 Sekunden bei 60°C
4. 30 Sekunden bei 72°C

Die Schritte 2 bis 4 wurden in 35 Zyklen wiederholt.

5. 1 Minute bei 72°C
6. Abkühlen auf 4°C

**Tabelle 11:** *Primersequenz GAPDH*

Primer	Nukleotidsequenz	Hersteller	Produktgröße
GAPDH	For 5'-GCTGCCAAATATGACGACATCA-3' Rev 5'-GTACCCAGGATGCCTTTGAG-3'	Microsynth	72 kb
CD90	For 5'-CCAAGGACGAGGGGACATAC-3' Rev 5'-AGCAGCCATGAGGTGTTCTG-3'	Eurofins	145 kb
CD105	For 5'-CCGCCGCACTGTGGTACATCTAC 3' Rev 5'-TGTGGTTGGTGCTACTGCTCTCTG-3'	Eurofins	108 kb
CD45	For 5'-GTTACGTTGACATCCTTCCTTATG-3' Rev 5'-GCAATGTATTCCTGGGTTCTTTG-3'	Eurofins	127 kb
CD14	For 5'-GCTCTCTGTCCGCAAAAGTTC-3' Rev 5'-AGCGAGTTGTGGCTGAGGTC-3'	Eurofins	

**Tabelle 12:** *Mastermix PCR*

Kit/Hersteller	Reagenz	1x Ansatz
GeneAMP GoldRNA PCR Core Kit (Applied Biosystems)	15 mM MgCl <sub>2</sub>	0,5 µl
	10x PCR GOLD Puffer	1 µl
Eurofins MWG Operon	10 pmol/µl GAPDH Primer forward	0,25 µl
Eurofins MWG Operon	10 pmol/µl GAPDH Primer reward	0,25 µl
	Aqua bidest.	8,5 µl
Biotherm	Biotherm Taq Polymerase	0,07 µl

Nach dieser Durchführung wurden die Proben bis zur Auswertung mittels Gelelektrophorese bei -20°C gelagert.

#### 3.2.5.4 Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der PCR-Produkte diente die Methode der Gelelektrophorese. Zuerst wurde ein 2%iges Agarosegel hergestellt. Hierfür wurde 1 g Agarose in 50 ml Tris-Acetat-EDTA (TAE) Puffer in der Mikrowelle aufgekocht und somit gelöst. Danach wurden 5 µl des Farbstoffes Gel Green<sup>TM</sup> Nucleic Acid Stain hinzugegeben. Das Gelgemisch wurde daraufhin in einen Gelträger gegossen und ausgehärtet. Anschließend wurde das feste Gel in eine Laufkammer (Biometra) eingebracht und die Kammer mit TAE-Puffer aufgefüllt. Den PCR-Produkten wurden je 3 µl 5x DNA Loading Buffer hinzugefügt. 5µl dieser Proben wurden vorsichtig in die Geltaschen pipettiert. Zudem wurde ein Quantitas DNA Marker 50bp- 2kb (Biozym) in eine weitere Gelvertiefung aufgetragen, um die PCR-Produktgröße zu ermitteln. Die Restbestände der PCR-Proben wurden für eine eventuelle Wiederholung der Gelelektrophorese bei -20°C eingefroren. Die gesamte Gelkammer wurde an das PowerPac<sup>TM</sup> Basic (BioRad) angeschlossen. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei der Einstellung von 125 V für 30 Minuten. Die folgende Auswertung erfolgte am Transilluminator UVsolo (Biometra). Konnten keine Banden bei den -RT-Proben, bei den +RT-Proben jedoch deutliche Banden beobachtet werden, wurde die cDNA für die weitere Untersuchung

verwendet. Bei sichtbaren Banden in den -RT-Proben musste die cDNA-Synthese wegen möglicher Kontamination oder Fehler während des Pipettierens wiederholt werden.

Ansetzen der Lösungen:

TAE-Puffer-Stammlösung (10x Puffer):

145,2 g Tris base und 11,1 g EDTA in 2800 ml Aqua bidest lösen, pH 8 mit Essigsäure einstellen und mit Aqua bidest auf 3000 ml auffüllen

TAE-Puffer-Gebrauchslösung:

Stammlösung 1:10 mit Aqua bidest verdünnen

### 3.2.5.5 Quantitative realtime PCR (qRT-PCR)

Zur Quantifizierung der Genexpression wurde die quantitative realtime PCR genutzt. Die Marker brain-derived neurotrophic factor (BDNF), glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF), nerve growth factor (NGF), microtubule-associated-protein 2 (MAP2),  $\beta$ -III-Tubulin, Nestin und glial fibrillary acidic protein (GFAP) wurden in undifferenzierten und neuronal differenzierten Stammzellen auf ihre Expressionsmuster überprüft. Als Referenzgen (housekeeping gene) diente die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). GAPDH wird in allen Zellen exprimiert und unterliegt keiner Regulierung. Somit können die Expressionen der neuronalen Marker mithilfe der GAPDH-Expression berechnet werden. Pro Primerpaar und Gen wurden jeweils drei Replikate angelegt, das heißt es wurden jeweils drei Wells der Platte mit der gleichen Kombination belegt. Zusätzlich wurde für jeden Primer eine „no template control“ (NTC) mitgeführt, in der die cDNA durch Aqua bidest. ersetzt wurde. Dies diente dem Ausschluss möglicher Kontaminationen der Reagenzien mit fremder DNA und zur Überprüfung einer Dimerbildung oder unspezifischer Bindung des Primers. In Tabelle 13 ist die Zusammensetzung des Mastermixes für die qRT-PCR dargestellt. Die Primersequenzen sind in Tabelle 14 aufgelistet.

**Tabelle 13:** *Mastermix qRT-PCR*

Reagenz	1x Ansatz
GoTaq® qPCR Master Mix	5 µl
Primer for/rev (je 10 pM)	0,6 µl
H <sub>2</sub> O	3,4 µl

**Tabelle 14:** *Verwendete Primer qRT-PCR*

Primer	Primer Sequenz	Hersteller	Produktgröße
Nestin	For 5'-GAACTCAGTGGGTCTGGAATG-3' Rev 5'-GTTTCCTGCTGCAAACGTTCAC-3'	Eurofins	117 bp
BDNF	For 5'-GAAGAGCTGTTGGACGAGGA-3' Rev 5'-GAGAAGAGGAGGCTCCAAAG-3'	Eurofins	119 bp
GDNF	For 5'-CTTCACAGAGCTCACGACCA-3' Rev 5'-AGCTTCAGCATCAGGAAGGAG-3'	Eurofins	123 bp
NGF	For 5'-CTCCGTCAACAGGACTCACA-3' Rev 5'-ATCACCTCCTTGCCCTTGATG-3'	Eurofins	141 bp
GFAP	For 5'-CAACCTGGCCAGTTATCGACA-3' Rev 5'-ACCTCCTCATCGTGGATCTTC-3'	Eurofins	122 bp
MAP2	For 5'-GCATTGAAGAATGGCAGATGATC-3' Rev 5'-CATTGGCGCTTCTGACAAGTC-3'	Eurofins	144 bp
β-III-Tubulin	For 5'-GACCGCATCATGAACACCTTC-3' Rev 5'-CATTGTCTGATGCAGTAGGTTCTC-3'	Eurofins	127 bp

Die Durchführung der qRT-PCR erfolgte mittels des CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System von BioRad.

#### 3.2.5.5.1 Statistische Auswertung

Die CFX™ Manager PCR Software liefert zu jedem Template einen Ct-Wert. Die Cq-Werte (quantification cycle value) aller PCR-Durchläufe wurden in Microsoft Excel 2010 exportiert

und die  $\Delta\Delta Cq$ -Werte ermittelt. Bei der  $\Delta\Delta Cq$ -Quantifizierung handelt es sich um eine relative Quantifizierung, bei der die  $Cq$ -Werte (Zykluszahl, bei der die Produktmenge einen definierten Schwellenwert erreicht) der zu quantifizierenden Transkripte verglichen werden. Die Normalisierung dieser Transkripte erfolgte gegen eine Kontrolle („housekeeping gen“ als Referenz), deren Transkriptmenge konstant war. Dabei wurden durch die Subtraktion des  $Cq$ -Wertes des „housekeeping gens“ vom  $\Delta Cq$ -Wert des Zielgens  $\Delta Cq$ -Werte ermittelt. Aus diesen Werten wurden  $\Delta\Delta Cq$ -Werte durch die Differenz der zu vergleichenden Bedingungen gebildet ( $\Delta Cq_{\text{(Zielgen)}} - \Delta Cq_{\text{(Referenzgen)}}$ ). Der  $n$ -fache Unterschied in der Genexpression ergab sich durch die Gleichung  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  und wird als relative Quantifizierung angegeben. Die gewonnenen Daten wurden anschließend anhand der Statistica10 Software ausgewertet.

Die in der Arbeit erhobenen Daten wurden zunächst einer deskriptiven Statistik unterzogen, um die Stichprobenmengen zu charakterisieren und die Voraussetzungen für die weiterführenden Analysen zu überprüfen. Alle Daten entstammten unabhängigen Stichproben. Zeigten die Daten eine Normalverteilung, so wurden im Anschluss parametrische Tests zur Auswertung verwendet.

Die Expression der neuronalen und glialen Gene sowie der neurotrophen Faktoren wurde mittels einer einfaktoriellen ANOVA (One-Way-ANOVA) statistisch ausgewertet. Mit dieser Varianzanalyse wurde überprüft, ob signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der untersuchten Proben bestanden. Hierfür wurde nach Unterschieden der Genexpression im Differenzierungsverlauf zu den drei untersuchten Zeitpunkten geschaut. Mittels student t-Test erfolgte die Überprüfung des Signifikanzlevels der untersuchten Proben. Weiterhin wurde die Genexpression von differenzierten und undifferenzierten cASCs mithilfe einer einfaktoriellen ANOVA ermittelt. Um die Ergebnisse der Varianzanalyse auf signifikante Unterschiede zu testen, wurden anschließend post-hoc Tests durchgeführt.

Die Ergebnisse der statistischen Auswertung sind als Mittelwert mit dazugehöriger Standardabweichung angegeben. Für die hier verwendeten Tests wurde das Signifikanzniveau als  $p$ -Wert dargestellt. Dabei wurden  $p$ -Werte  $< 0,05$  als signifikante Unterschiede angesehen, während  $p$ -Werte  $> 0,05$  demnach als nicht signifikantes Ergebnis gewertet wurden.

Bei der statistischen Auswertung lagen die Schwerpunkte auf folgenden Fragestellungen:

Gibt es Unterschiede in der Expression der neuronalen Gene im Hinblick auf den Differenzierungsverlauf?

Werden die neuronalen Gene in neuronal differenzierten Zellen höher exprimiert als in undifferenzierten Zellen?



### 3.3.5.6 Western Blot

#### 3.3.5.6.1 Gießen der Gele

Der Gelgießstand „Mini PAGE Elektroblothing-System, shiroGEL“ (VWR) wurde nach Herstellerangaben aufgebaut. Das Trenngel zur Auftrennung der Proteine wurde mit den in Tabelle 15 aufgelisteten Reagenzien hergestellt und 5 ml davon zwischen die beiden Glasplatten pipettiert. Danach wurde das Trenngel mit circa 0,5-1 ml Wasser überschichtet. Das im Trenngel enthaltene Ammoniumperoxodisulfat führte zu einer Polymerisation, die circa 20-30 Minuten dauerte. Anschließend konnte das Sammelgel hergestellt werden, in dem die Proteine komprimiert wurden. Dieses Sammelgel wurde mithilfe einer Pipette bis zur Oberkante zwischen den beiden Glasplatten gefüllt. Daraufhin wurde der Probentaschenkamm schräg zwischen die Glasplatten eingeschoben. Dabei musste darauf geachtet werden, dass keine Luftblasen entstanden. Nun folgte eine weitere Polymerisation für circa 20-30 Minuten. Danach wurde der Kamm vorsichtig aus dem Gel herausgezogen und der Gelgießstand mit Kathodenpuffer aufgefüllt.

**Tabelle 15:** Zusammensetzung des Jagow(Tricin)-Minigels

Reagenz	Trenngel 7,5%	Sammelgel 4%
Acrylamid	2,3 ml	500 µl
Jagow-Gelpuffer	4 ml	1,25 ml
Aqua bidest.	5,7 ml	3.25 ml
TEMED	6 µl	5 µl
10% APS	60 µl	50 µl

Acrylamid: 40%, 29:1

Gelpuffer:	3M Tris-HCl pH 8,45	364g/L
	0,3% SDS	30 ml 10% SDS/L

### 3.3.5.6.2 Probenvorbereitung

Bevor die Proben in der Elektrophorese verwendet werden konnte, wurden pro Probe je 5%iges  $\beta$ -Mercaptoethanol hinzugegeben. Daraufhin wurden die Proben im Protein Lysis Buffer im Thermocycler für 5 Minuten bei 95°C aufgekocht. Dieser Vorgang diente dem Denaturieren und Reduzieren der Proteine.

Als Proben wurden exemplarisch für die restlichen Spenderhunde die Hunde 12/15 und 5/14 gewählt. Als Positivkontrolle diente das auch in den anderen Versuchen untersuchte canine Hirngewebe, von dem zuvor ein Protein-Lysat angefertigt wurde. Zur Überprüfung der Antikörper und als Negativkontrolle wurden humane Teratokarzinomzellen verwendet, die ebenfalls vorher neuronal differenziert wurden.

### 3.3.5.6.3 Auftragen der Proben

Je 10  $\mu$ l einer Probe wurden in eine Tasche eines 12er Zählkammes mithilfe einer Hamilton-Pipette pipettiert. Zusammen mit den Proben wurden ebenfalls 10  $\mu$ l des Proteingelmarkers (1:10 in Loading-Buffer) in eine Tasche gegeben.

Anschließend wurde der gesamte Gelgießstand mit Anodenpuffer aufgefüllt.

Loading-Buffer:	6M Harnstoff	18g/50ml
	2% SDS	1g/50ml
	10% Glycerin	5ml/50ml
	0,01% Bromphenolblau	5mg/50ml
	6,25 mM Tris-HCl pH 6,8	312 $\mu$ l Tris-HCl pH 6,8/50 ml
10x Anodenpuffer:	2M Tris-HCl pH 8,9	242 g/L
10x Kathodenpuffer:	1M Tris-HCl pH 8,25	121 g/L
	1M Tricin	179 g/L
	1% SDS	10 g/L

#### 3.3.5.6.4 SDS-Gelelektrophorese

Bei der SDS-Gelelektrophorese wandern die durch SDS negativ geladenen Proteine zum Pluspol. Nach dem Aufsetzen der Abdeckung der Apparatur wurde die gesamte Gelkammer an das PowerPac™ Basic (BioRad) mit einer Spannung von zunächst 75V angeschlossen. Traten die Proben aus dem Sammelgel in das Trenngel über, wurde die Spannung auf 100-130V erhöht. Sobald die blaue Farbstoffbande das Ende des Gels erreichte, konnte die Elektrophorese beendet werden. Dieser Vorgang dauerte circa 2 Stunden.

Anschließend wurde der Gelgießstand auseinandergebraut und das Gel konnte für die weitere Versuchsdurchführung verwendet werden.

#### 3.3.5.6.5 Blotting

Das Blotting-Verfahren diente dem Transfer der zuvor elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Membran. Bei der Membran handelte es sich um eine Nitrocellulosemembran. Das gesamte Blotting-Verfahren wurde bei einer Temperatur von circa 4 °C durchgeführt.

Das aus der Elektrophorese gewonnene Gel wurde zunächst zurechtgeschnitten, der obere Teil, das Sammelgel, wurde nicht mehr benötigt, da sich die Proteine im Trenngel befanden. Das Gel wurde vorsichtig innerhalb einer Schale mit gekühltem Western Blot-Buffer auf die Nitrocellulosemembran gelegt. Die Membran selbst wurde auf einen Schwamm gelegt. Auf das Gel wurde nun ein zurechtgeschnittenes Filterpapier gebracht. Der Schwamm wurde einmal zusammengeklappt und das so entstandene „Transfer-Sandwich“ konnte zusammen mit einem Eisblock zur Kühlung in den Gelgießstand eingesetzt werden. Dabei musste darauf geachtet werden, dass das Gel in Richtung der Anode zeigte und die Membran in Richtung der Kathode. Auch hier kam wieder das PowerPac™ Basic (BioRad) zum Einsatz. Geblottet wurden die Proteine bei 350 mA für circa 2 Stunden.

Nach dem „Blotting“ wurde der Gelgießstand auseinandergebaut. Die Membran mit den transferierten Proteinen wurde mit „Ponsceau S“ circa 1 Minute auf dem Schüttler gefärbt und anschließend dreimal mit PBS+0,1% Tween gewaschen, bis die Banden der gefärbten Proteine sichtbar wurden. Die „Ponsceau S“-Färbung dient zur Überprüfung, ob die Proteine auf die Membran übertragen wurden. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Membran über Nacht bei 4°C mit 2,5 g handelsüblichem Magermilchpulver in 50 ml PBS+0,1% Tween.

10x Western Blot-Buffer: (nach Maniatis)	390 mM Glycin 480 mM Tris	29,3 g/L 58,1 g/L
1X Western Blot-Buffer:	100 ml 10X Western Blot-Buffer + 200 ml Methanol + 700 ml Aqua bidest.	

### 3.3.5.6.6 Antikörperinkubation

Am nächsten Tag wurde die Milchpulverlösung verworfen und die Membran dreimal für je 2 Minuten mit PBS+0,1% Tween auf dem Schüttler gewaschen. Dann wurde die Membran so zurechtgeschnitten, dass die zu untersuchenden Proben jeweils auf einem Teil der Membran mit einem Primärantikörper inkubiert werden konnten. Anschließend wurden die Antikörper in PBS+0,1% Tween wie in Tabelle 16 beschrieben angesetzt. Die Membranen wurden mit je 5 ml Antikörperlösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert.

Danach wurde der Primärantikörper durch dreimaliges Waschen für je 5 Minuten entfernt.

Nun erfolgte die Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (Tabelle 17). Dafür wurden die Sekundärantikörper in 5 ml PBS+0,1% Tween angesetzt und die Membranen darin für 45 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Membranen fünfmal für je 5 Minuten gewaschen.

**Tabelle 16:** *Verwendete Primärantikörper für den Western Blot*

Primärantikörper	Spezies, Klonalität	Konzentration	Verdünnung	Hersteller
Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)	Maus, monoklonal	6,2 mg/ml	1:2000	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Mouse anti-microtubules associated protein (MAP2)	Maus, monoklonal	0,5 mg/ml	1:100	Invitrogen, Life technologies, Kalifornien, USA
Mouse anti-A2B5	Maus, monoklonal	0,5 mg/ml	1:200	Invitrogen, Life technologies, Kalifornien, USA
Neuronal Class III $\beta$ -Tubulin	Kaninchen, polyklonal	1 mg/ml	1:5000	Covance, Kalifornien, USA
Mouse anti-Nestin	Maus, monoklonal	250 $\mu$ g/ml	1:500	BD Biosciences, Kalifornien, USA

**Tabelle 17:** *Verwendete Sekundärantikörper für den Western Blot*

Sekundärantikörper	Verdünnung	Hersteller
GoatAnti-mouse igG HRP-conjugate	1:5000	Advansta, Menlo Park, Kalifornien, USA
Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-rabbit IgG	1:5000	Dianova, Hamburg, Deutschland

### 3.3.5.6.7 Entwickeln des Blots

In einem weiteren Schritt erfolgte die Entwicklung des Blots. Durch die Reaktion des Chemilumineszenzsubstrates mit der Peroxidase erfolgt eine Lichtreaktion. Somit konnten die Proteinbanden auf der Membran sichtbar gemacht werden. Hierfür wurden die Membranen mit der Bandenseite für 30 Sekunden auf eine Lösung des Pierce® ECL Western Blotting Substrate gelegt. Daraufhin erfolgte in der Rotlichtkammer die Entwicklung des Röntgenfilms. Hierfür wurde ein Röntgenfilm auf die Membran innerhalb einer Röntgenkassette für circa 30 Sekunden aufgelegt. Anschließend folgte eine Inkubation in einer Entwicklungslösung, bis die Banden auf dem Film zu erkennen waren. Die Dauer dieses Schrittes richtet sich nach der Bandenintensität und beträgt circa 1-5 Minuten. Die Entwicklungsreaktion wurde durch Eintauchen des Films für 30 Sekunden in 2%iger Essiglösung gestoppt. Im nächsten Schritt wurde der Film für 2-3 Minuten in einer Fixierlösung fixiert, daraufhin mit Leitungswasser gespült und schließlich getrocknet. Die Banden des Proteinmarkers mussten zum Schluss per Hand auf den Film aufgetragen werden, da der Marker nicht mit der Peroxidase gekoppelt war und deshalb nicht auf den Film übertragen wurde.

Entwicklungslösung:

430 ml Leitungswasser werden mit 70 ml „Tetenal Fixierer“ vermischt

2%ige Essigsäure:

Auf 500 ml Leitungswasser werden 10 ml 100%ige Essigsäure gegeben

Fixierlösung:

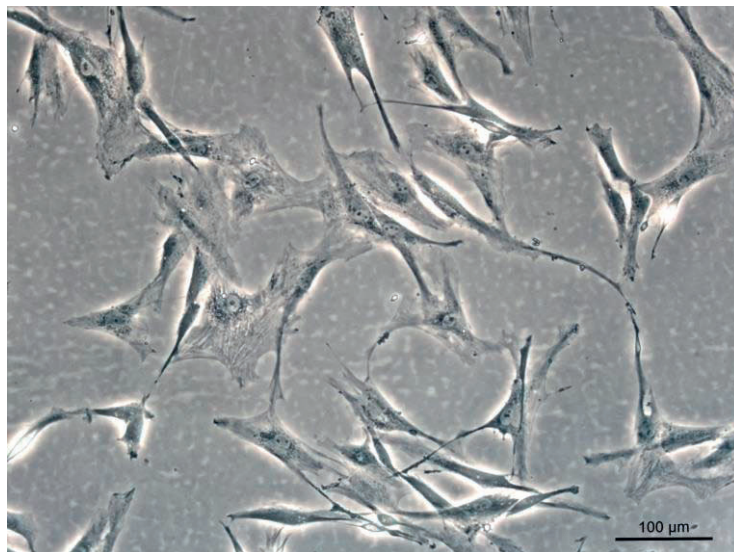
400 ml Leitungswasser werden mit 100 ml „Tetenal Superfix Plus“ vermischt

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Charakterisierung der cASCs

#### 4.1.1 Kultivierung und Morphologie von undifferenzierten cASCs

Die caninen Stammzellen konnten problemlos aus dem Fettgewebe isoliert und anschließend im Labor kultiviert und expandiert werden. Bereits einen Tag nach dem Ausplattieren in Zellkulturflaschen waren angewachsene Zellen auf dem Flaschenboden sichtbar. In Kultur fanden sich Zellen mit einer flachen, meist spindelförmigen, Fibroblasten-ähnlichen Morphologie (Abb.3).

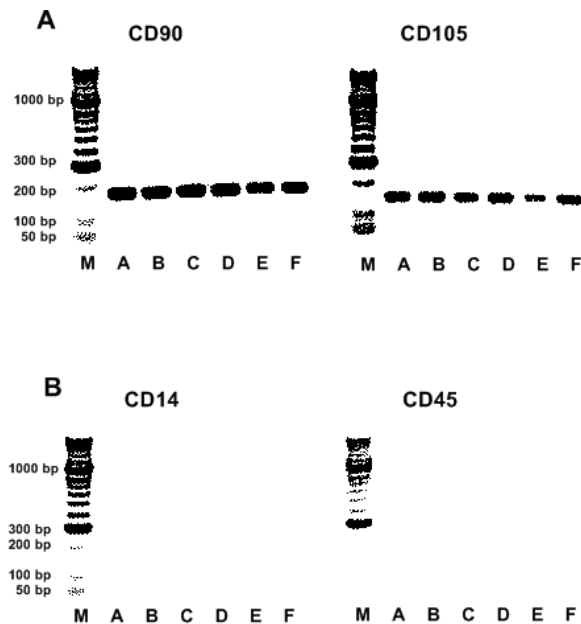


**Abbildung 3: Morphologie von cASCs:** *cASCs der Passage 2 zeigen nach einem Tag Kultivierung eine Fibroblasten-ähnliche Morphologie.*

#### 4.1.2 Expression stammzellenspezifischer Marker

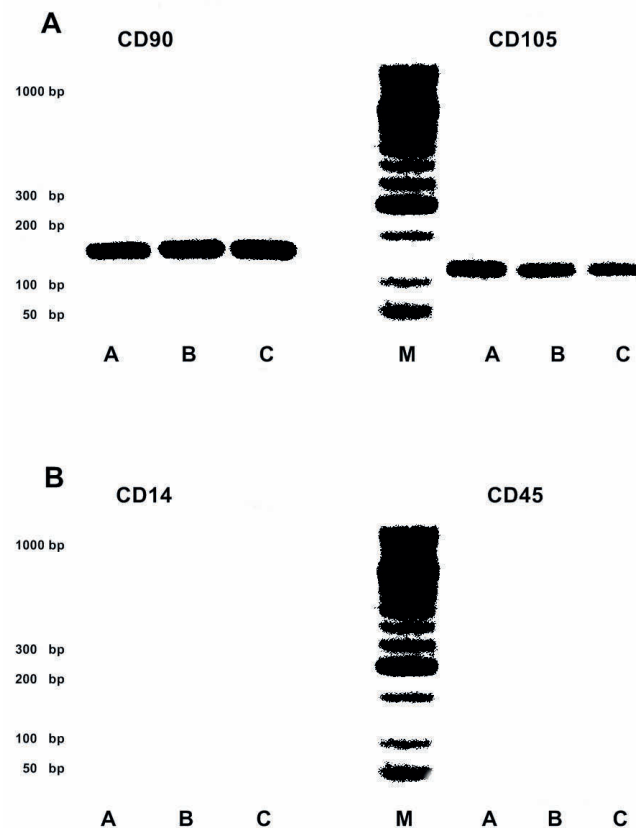
Mittels RT-PCR wurde die Expression der stammzellenspezifischen Zelloberflächenmarker CD90 und CD105 überprüft (Abb. 4A und 5A). Anhand dieser Untersuchung konnte gezeigt werden, dass es sich bei allen isolierten und für die beschriebenen Versuche verwendeten caninen Zellen um Stammzellen handelte. Zur weiteren Analyse wurde ebenfalls die Expression der Oberflächenmarker CD14 und CD45 untersucht, die als Negativmarker

gelten. Tatsächlich waren CD14 und CD45 in der PCR für alle untersuchten Hunde negativ (Abb. 4B und 5B). In Abbildung 4 und 5 sind die Ergebnisse der Gelelektrophorese der PCR-Produkte für die untersuchten Marker dargestellt.



**Abbildung 4: Gelelektrophorese der PCR-Produkte für die Oberflächenmarker (A) CD90, CD105 und (B) CD 14, CD45. A: Hd 2/14, B: Hd 4/14, C: Hd 5/14, D: Hd 15/14, E: Hd 12/15, F: Hd 129/10, M: Marker. CD90: Produktgröße 145 bp, CD105: Produktgröße 108 bp.**





**Abbildung 5: Gelelektrophorese der PCR-Produkte für die Oberflächenmarker (A) CD90, CD105 und (B) CD14, CD45. A: Hd 7/13, B: Hd 11/13, C: Hd 16/13, M: Marker. CD90: Produktgröße 145 bp, CD105 Produktgröße 108 bp.**

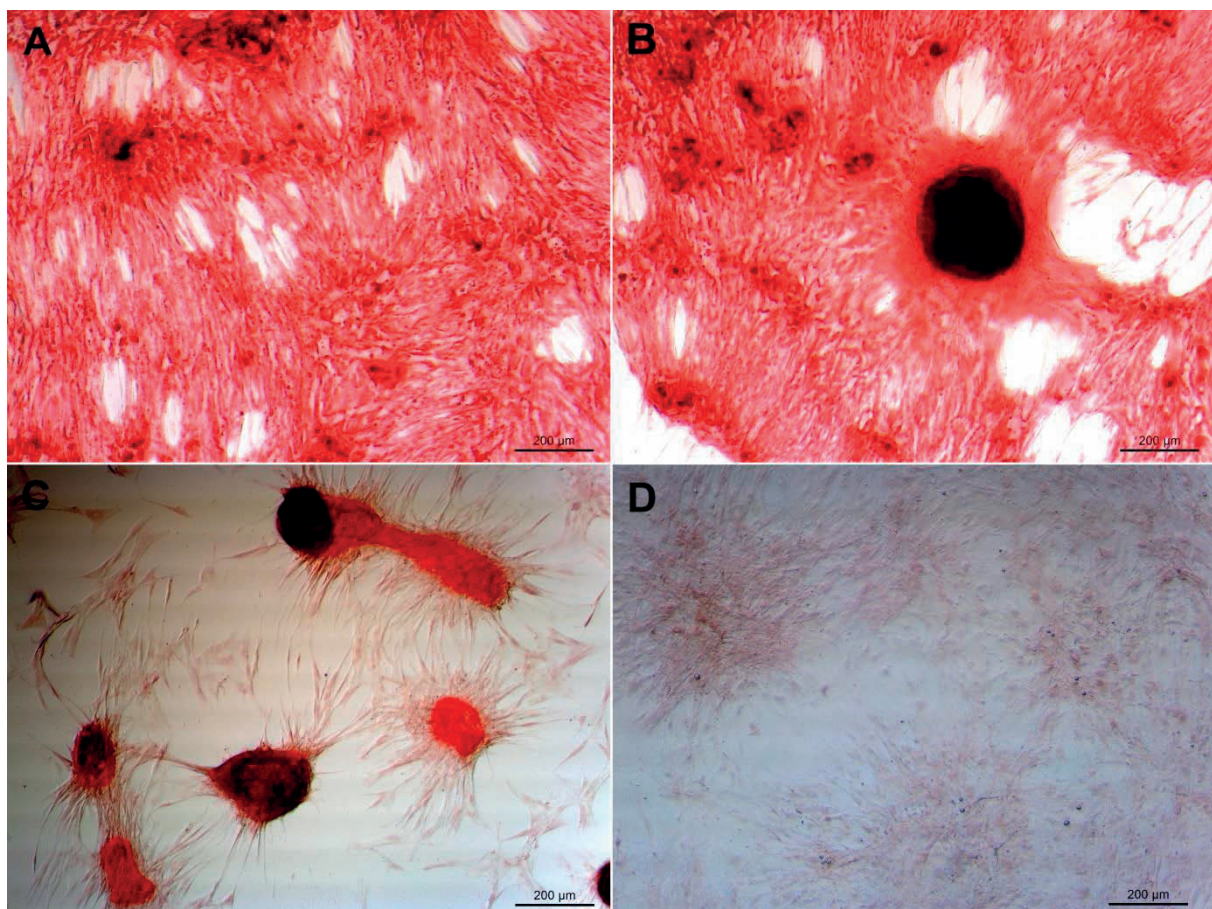
#### 4.1.3 Pluripotenz der Stammzellen

Für eine weitere Charakterisierung der caninen Stammzellen wurde ihre Pluripotenz, d.h. ihre Differenzierungsfähigkeit untersucht. Hierfür erfolgte die Durchführung einer osteogenen, adipogenen und chondrogenen Differenzierung. Die hierbei gewonnenen Ergebnisse sind nachfolgend dargestellt.

##### 4.1.3.1 Osteogene Differenzierung

Die osteogene Differenzierung der cASCs wurde zunächst mit einem in der Arbeitsgruppe etablierten Protokoll untersucht. Anhand der Alizarinrot-Färbung konnten jedoch keine Calciumeinlagerungen nachgewiesen werden. Basierend auf der Arbeit von Reich (2010) wurden dem osteogenen Differenzierungsmedium daraufhin zusätzlich unterschiedliche

Calciumkonzentrationen zugegeben. Die osteogene Differenzierung wurde somit unter der Zugabe von 5 mM  $\text{CaCl}_2$  und 7,5 mM  $\text{CaCl}_2$  untersucht. Abbildung 6 zeigt die osteogene Differenzierung der cASCs nach 7 Tagen (Abb. 6A und B) und 14 Tagen (Abb. 6C). Die Differenzierung wird hier exemplarisch für einen Spenderhund gezeigt. In der Monolayerkultur fiel auf, dass sich die Zellen im Laufe der osteogenen Differenzierung zu einer Zellanhäufung zusammenfinden. Eine Mineralisierung konnte hierbei in einigen, aber nicht in allen Zellen nachgewiesen werden. In den Negativkontrollen ließ sich keine solche Verfärbung nachweisen.



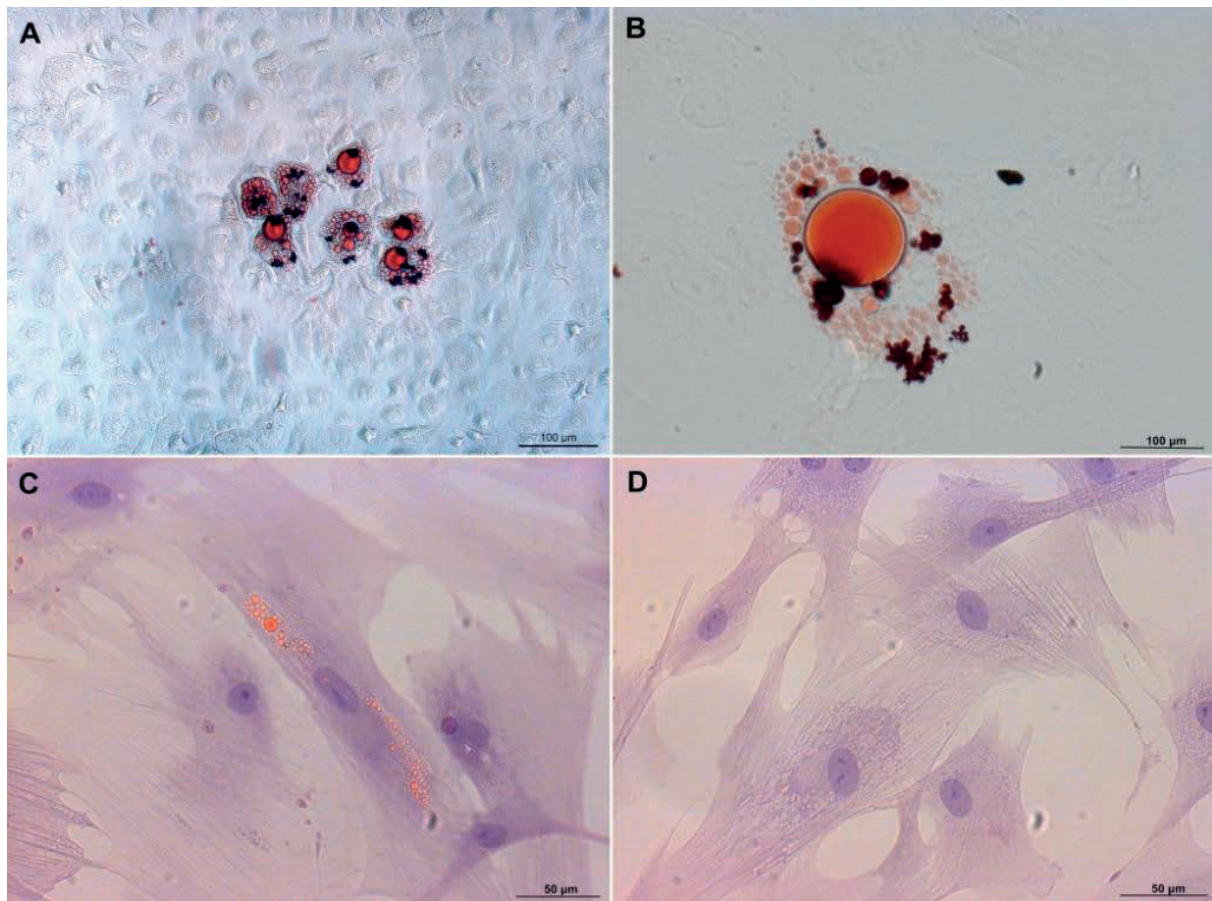
**Abbildung 6: Alizarinrot-Färbung der cASCs nach 7 und 14 Tagen.** (A) und (B) Hd 7/13 nach 7 Tagen osteogener Differenzierung mit 7,5 mM Calcium-Zusatz, (C) Hd 7/13 nach 14 Tagen osteogener Differenzierung mit 5 mM Calcium-Zusatz, (D) Hd 7/13 Negativkontrolle.

#### 4.1.3.2 Adipogene Differenzierung

Unter Verwendung des allgemeinen Protokolls für die adipogene Differenzierung konnten keine Veränderungen zwischen differenzierten und undifferenzierten Zellen nachgewiesen werden. Aufgrund dessen wurden die cASCs mit unterschiedlichen adipogenen Differenzierungsmedien zur Differenzierung induziert. Durch die Inkubation mit „rabbit serum“ und Rosiglitazon konnte schließlich eine positive Differenzierung der cASCs erreicht werden.

Die Beurteilung der Untersuchung erfolgte histologisch mittels der spezifischen Oil Red O-Färbung.

Die adipogen differenzierten Zellen wiesen rot-orange gefärbte Fettvakuolen im Zytoplasma auf (Abb. 7A und B). Jedoch ließen sich nicht in allen differenzierten Zellen diese Fettvakuolen feststellen (Abb. 7B). Die Negativkontrollen waren völlig frei von gefärbten Fettvakuolen (Abb. 7D).



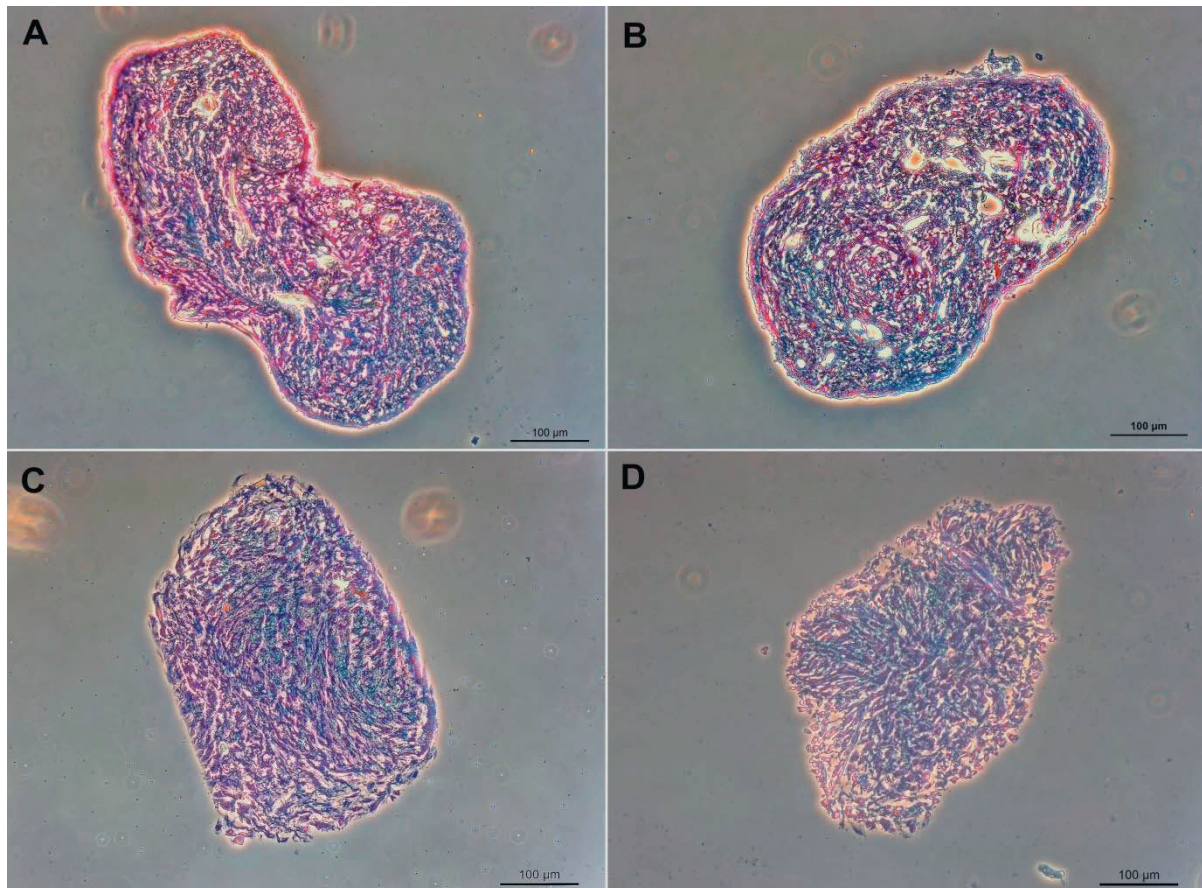
**Abbildung 7: Oil Red O-Färbung der cASCs nach 7 und 14 Tagen.** (A) Hd 15/14 nach 7 Tagen adipogener Differenzierung, (B) Hd 15/14 nach 14 Tagen adipogener Differenzierung, (C) Hd 12/15 nach 21 Tagen adipogener Differenzierung, (D) Hd 15/14 Negativkontrolle.

#### 4.1.3.3 Chondrogene Differenzierung

Nach 21 Tagen in der Pelletkultur zeigte sich nach Färbung mit Alcianblau eine Glycosaminoglykan-reiche Matrix. Diese positive Färbung war in den chondrogen differenzierten wie auch in den undifferenzierten Zellen des Pellets zu beobachten. Während und nach der Differenzierung war zu erkennen, dass die undifferenzierten Pellets kleiner waren als die chondrogen differenzierten Pellets.



Im Gegensatz zu den Negativkontrollen zeigten die differenzierten Pellets im Zentrum häufig degenerative Veränderungen und apoptotische Zellen (Abb. 8A und B). Ebenso erschienen die differenzierten Pellets mehrschichtiger als die undifferenzierten Pellets und die differenzierten Zellen zeigten einen stärkeren Zellverbund als die Negativkontrollen. Die extrazelluläre Matrix wirkte im differenzierten Pellet organisierter als im undifferenzierten Pellet. In Abbildung 8 sind die Ergebnisse der chondrogenen Differenzierung exemplarisch anhand des Spenders Hd 5/14 dargestellt.



**Abbildung 8: Alcianblau-Färbung der cASCs nach 21 Tagen.** (A) und (B) Hd 5/14 nach 21 Tagen chondrogener Differenzierung, (C) und (D) Hd 5/14 Negativkontroll-Pellet.

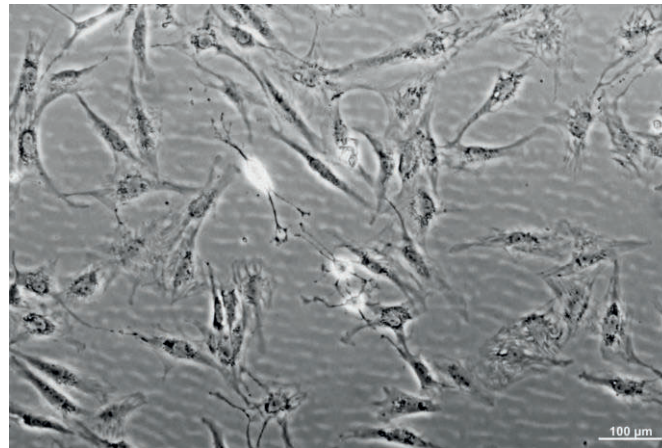
## 4.2 Neuronale Differenzierung der cASCs

### 4.2.1 Morphologie von neuronal differenzierten cASCs

In Vorversuchen zur Etablierung der optimalen Untersuchungszeitpunkte der neuronalen Differenzierung, wurden die Zellen zunächst für 10 Tage differenziert und beobachtet. Hierbei fiel auf, dass viele Zellen bereits nach 5 Tagen im Differenzierungsmedium starben. Aufgrund dieser Beobachtungen, die sich mit den Erkenntnissen der aktuellen Literatur decken, erwies es sich als sinnvoll, die Morphologie der Zellen und die Expression neuraler Marker sowie der Neurotrophine 3, 24 und 72 Stunden nach Start der Differenzierung zu untersuchen. Es wurde die veränderte Morphologie der wenigen Zellen, die am längsten überlebten, fotografisch festgehalten.

Nach Zugabe des neuronalen Differenzierungsmediums zeigte die ursprünglich flache Gestalt der Zellen bereits nach einer Stunde eine Veränderung in ihrer Morphologie (Abb. 9). Es ließen sich Zellen erkennen, deren Zytoplasma in Richtung des Somas zusammengezogen war. Das Soma und dessen umliegender Bereich erschienen hell leuchtend und rundlicher als bei undifferenzierten cASCs. Es bildeten sich längere und kürzere Zellausläufer mit Verzweigungen. Nach 72 Stunden Differenzierung zeigten alle Zellen eine neural-spezifische Morphologie mit langen Dendriten-ähnlichen Ausläufern.

Neben der morphologischen Veränderung wurde auch das Verhältnis von differenzierten und undifferenzierten Zellen während des Verlaufes der Differenzierung zu allen drei Untersuchungszeitpunkten festgestellt. Die cASCs veränderten ihre Morphologie nicht alle gleichzeitig. So ließen sich zum Differenzierungszeitpunkt von 3 Stunden 27,16% differenzierte und 72,84% undifferenzierte Zellen feststellen (Tab. 18). Dieses Verhältnis änderte sich im weiteren Verlauf insofern, als dass nach 72 Stunden 96,3% differenzierte und 3,7% undifferenzierte Zellen bestimmt wurden.



**Abbildung 9:** Morphologie neuronal differenzierter cASCs nach 1h.

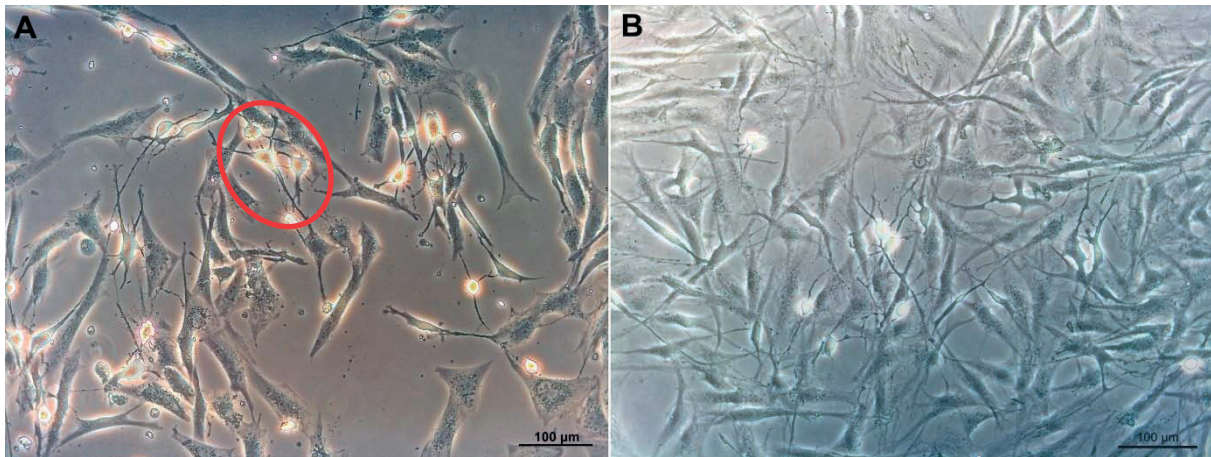
**Tabelle 18:** Prozentualer Anteil an un- und differenzierten Zellen im Differenzierungsverlauf.

	3h Differenzierung	24h Differenzierung	72h Differenzierung
<b>undifferenzierte cASCs</b>	72,84%	34,57%	3,7%
<b>differenzierte cASCs</b>	27,16%	65,43%	96,3%

#### 4.2.1.1 Morphologie der cASCs nach 3 Stunden neuronaler Differenzierung

cASCs reagierten bereits 3h nach Zugabe des neuronalen Differenzierungsmediums mit einer Veränderung ihrer Morphologie. Einige Zellen zeigten ein Zurückziehen des Zytoplasmas in Richtung Soma und formten einen zusammengezogenen Zellkörper (Abb. 10A, Markierung). Ebenfalls ließen sich Fortsatz-ähnliche Ausläufer des Somas erkennen, die in die Peripherie gerichtet waren. Zellen, die eine veränderte Morphologie aufwiesen, zeigten hell leuchtende Zellkörper. Neben diesen morphologisch veränderten Zellen konnten viele weitere undifferenzierte Zellen erkannt werden.

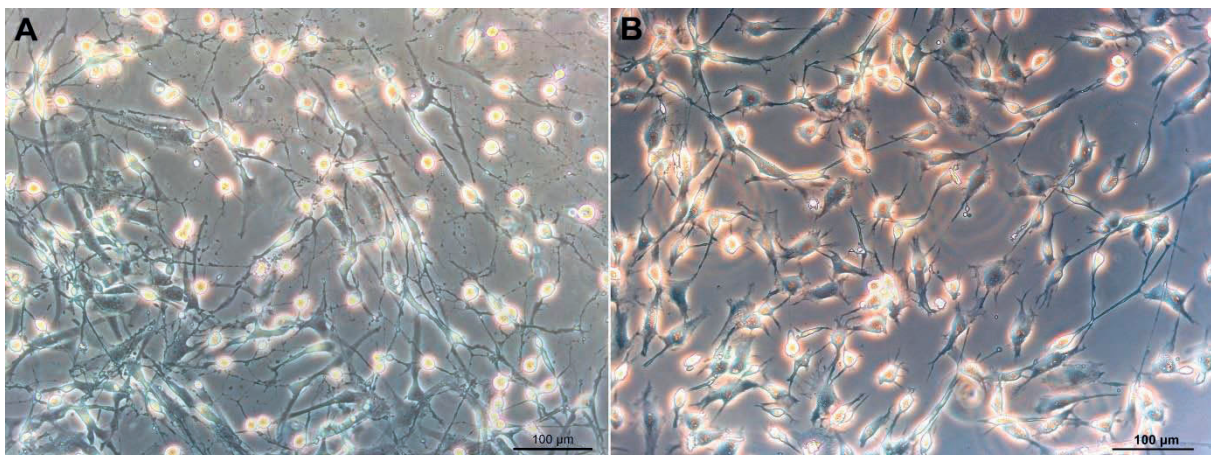




**Abbildung 10: Morphologie neuronal differenzierter cASCs nach 3h.** (A) Hd 16/13 nach 3h neuronaler Differenzierung, (B) Hd 4/14 nach 3h neuronaler Differenzierung.

#### 4.2.1.2 Morphologie der cASCs nach 24 Stunden neuronaler Differenzierung

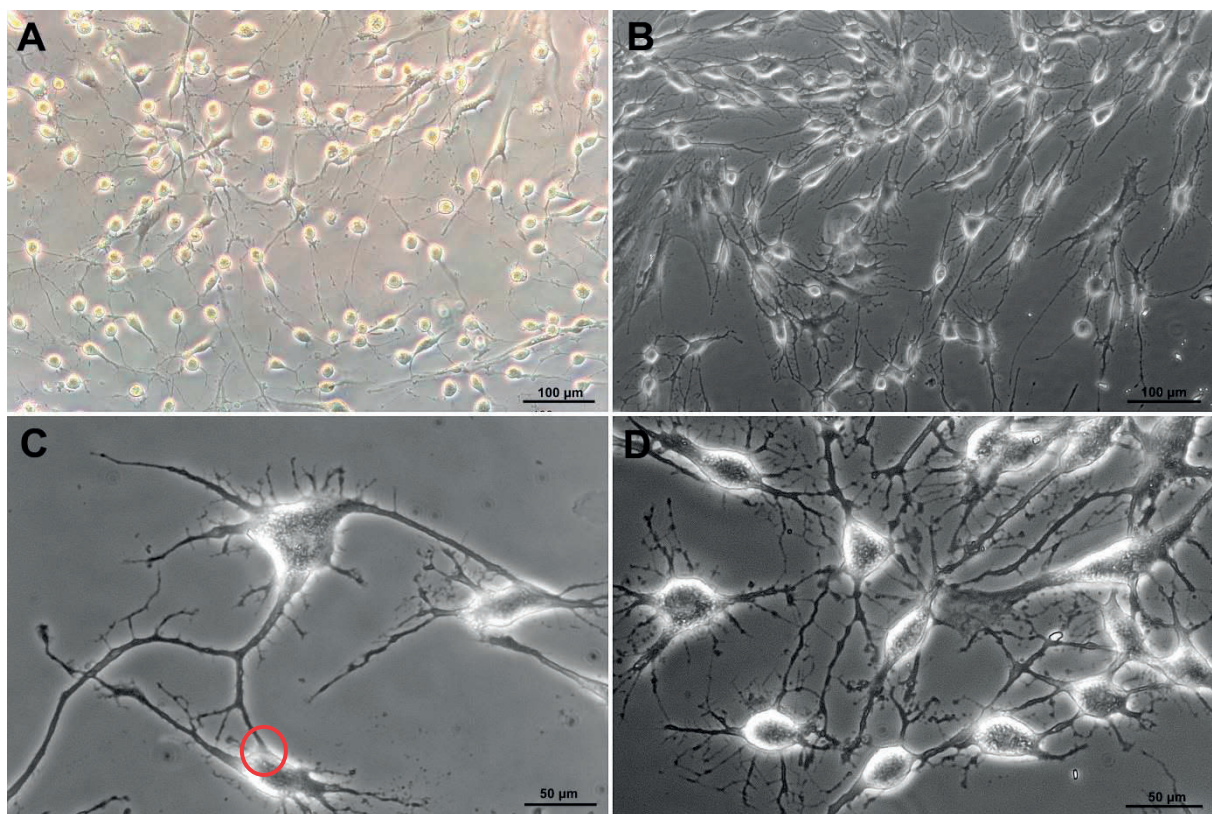
Nach 24h neuronaler Differenzierung zeigten deutlich mehr Zellen eine veränderte Morphologie als zum Untersuchungszeitpunkt von 3h. Auch hier zog sich das Zytoplasma in Richtung des Nukleus zurück und die Zellkörper leuchteten hell auf (Abb. 11A und B). Es bildeten sich lange Zellausläufer und die meisten Zellen zeigten eine zusammengezogene und rundliche Gestalt. Zu diesem Zeitpunkt der Differenzierung konnten auch Zellen erkannt werden, die abgeflacht erschienen und damit als undifferenziert bestimmt werden konnten.



**Abbildung 11: Morphologie neuronal differenzierter cASCs nach 24h.** (A) Hd 4/14 nach 24h neuronaler Differenzierung, (B) Hd 16/13 nach 24h neuronaler Differenzierung.

#### 4.2.1.3 Morphologie der cASCs nach 72 Stunden neuronaler Differenzierung

Nach 72 Stunden neuronaler Differenzierung zeigten fast alle Zellen in der Kultur eine veränderte Form. In Abbildung 12 ist zu erkennen, dass das Soma rundlich hell und das Zytoplasma zusammengezogen erscheinen (Abb 12A und B). Die einzelnen Zellausläufer sind verzweigt und zeigen neben den primären Ausläufern nun auch sekundär ausgebildete Fortsätze. Ebenso entwickelten sich um den Zellkörper herum kleinere Ausläufer (Abb. 12C und D). Weiterhin ist zu erkennen, dass Zellausläufer einer Zelle zu Fortsätzen oder zu dem Soma einer anderen Zelle hin gerichtet sind (Abb. 12C).



**Abbildung 12: Morphologie neuronal differenzierter cASCs nach 72h.** (A) Hd 5/14 nach 72h neuronaler Differenzierung, (B), (C) und (D) Hd 16/13 nach 72h neuronaler Differenzierung. Die rote Markierung stellt eine Kontakzone zwischen zwei Zellen dar.

#### 4.2.1.4 Morphologie der cASCs nach 7 Tagen neuronaler Differenzierung

Nach 7 Tagen konnten einige Zellen beobachtet werden, die über ihre Zellausläufer Verbindungen zu anderen Zellen aufnahmen. Abbildung 13 zeigt einen Axon-ähnlichen Ausläufer einer Zelle, der in Kontakt mit einer weiteren Zelle steht. Im Bereich dieser



Kontaktzone lässt sich erkennen, dass sich der lange Ausläufer verbreitert und mehrere kleine Fortsätze ausbilden (Abb. 13).

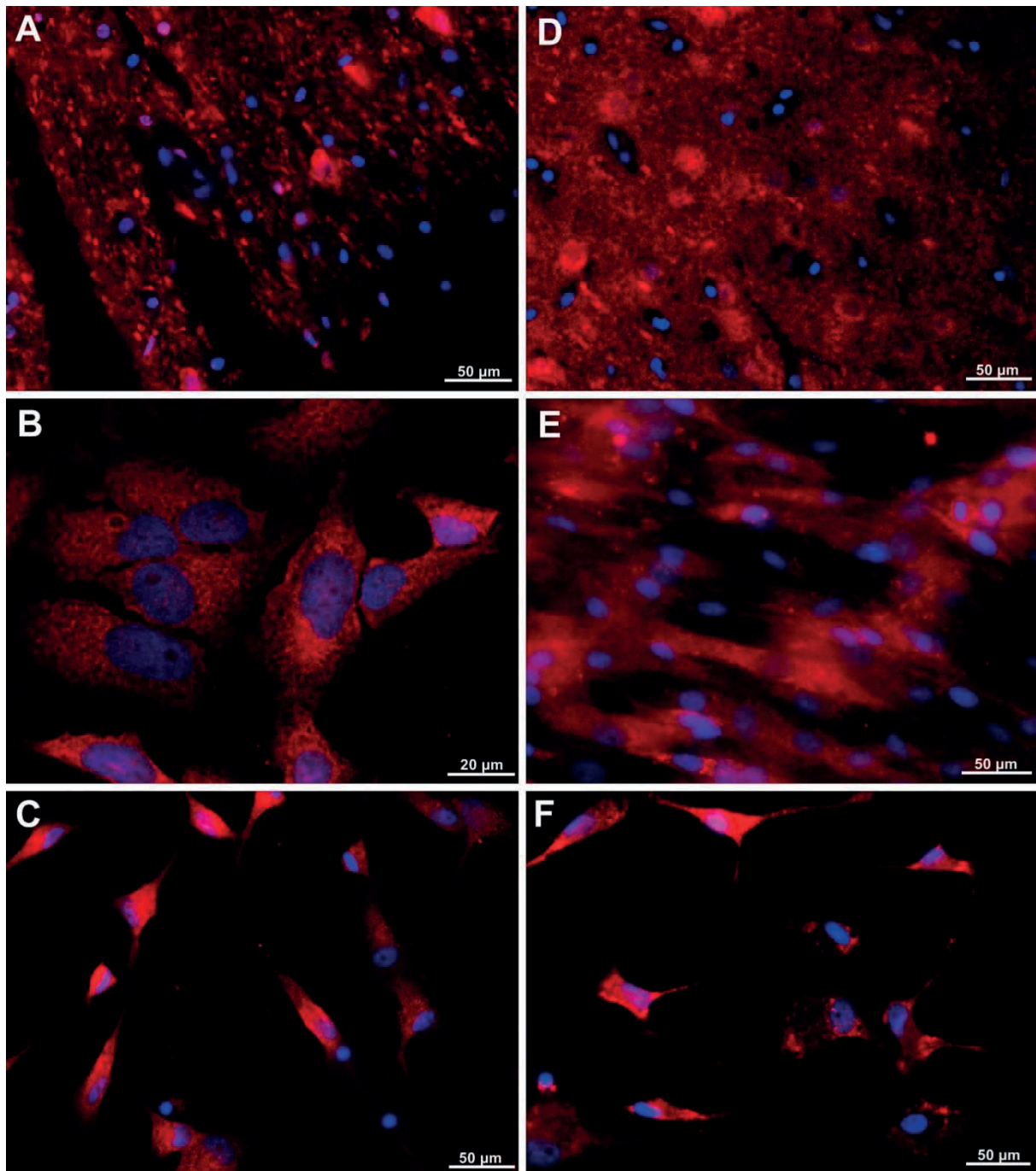


**Abbildung 13: Darstellung einer Kontaktzone der cASCs nach 7 Tagen neuronaler Differenzierung.** Lichtmikroskopische Aufnahme von Hd 16/13. Es lässt sich eine Axon-ähnliche Struktur mit einem Wachstumskegel erkennen, die eine synapsenartige Verbindung zu einer anderen Zelle aufnimmt. Die rote Markierung stellt eine Kontaktzone zwischen zwei Zellen dar.

#### 4.2.2 Immunhistochemie

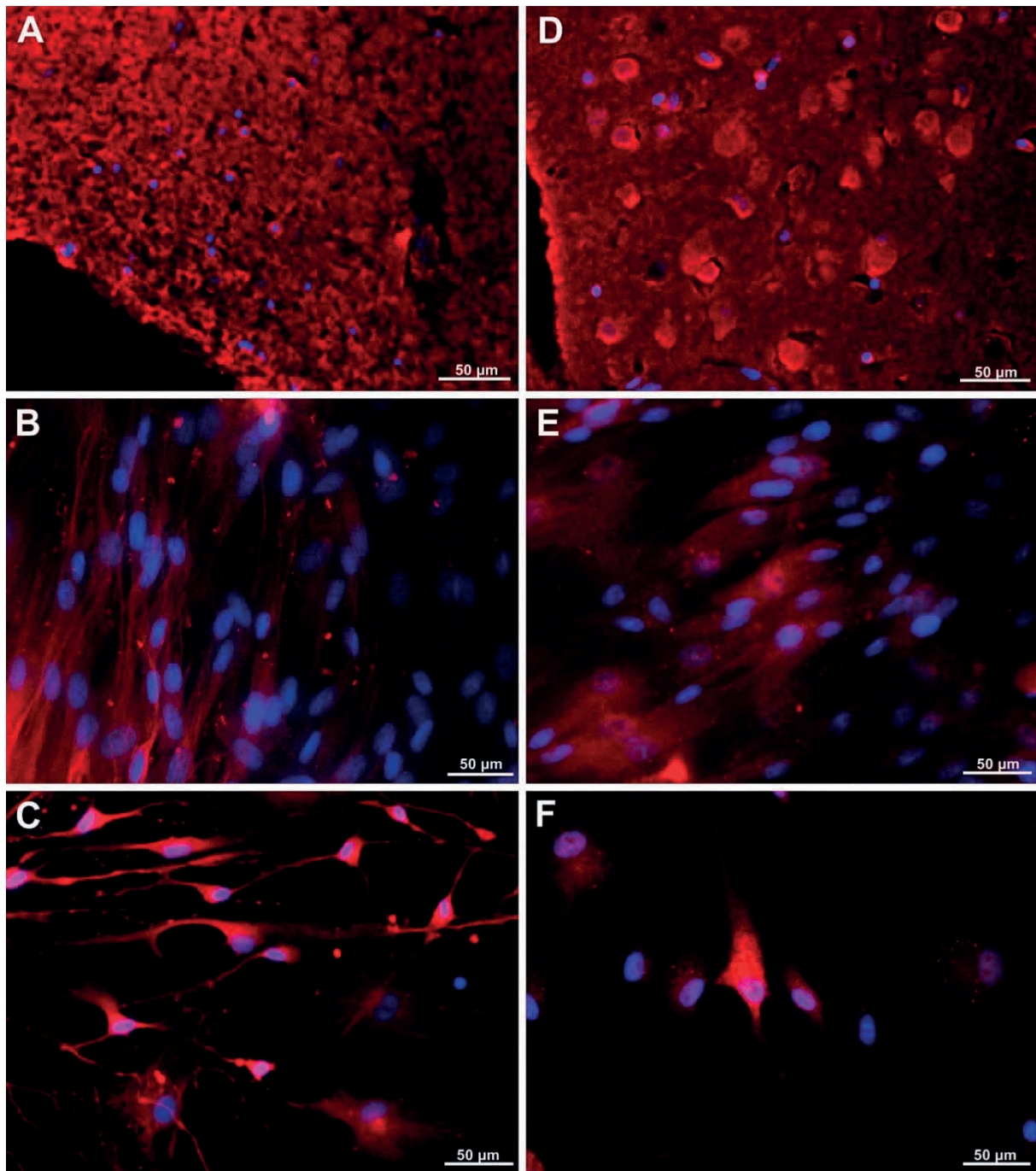
Die Expression neuraler Gene wurde mittels Immunhistochemie in undifferenzierten und differenzierten Zellen sowie im caninen Hirngewebe untersucht. Für diese Analyse dienten Zellen, die 72 Stunden mit neuronalem Differenzierungsmedium inkubiert wurden.

Alle untersuchten neuronalen und glialen Marker wurden auch in undifferenzierten Zellen exprimiert (Abb. 14-16). Die Expression der neuronalen Marker  $\beta$ -III-Tubulin und MAP2 war hauptsächlich im Zytoplasma der differenzierten und undifferenzierten Zellen lokalisiert. Ebenso ließ sich eine positive Expression beider Marker im Kontrollgewebe (Hundehirn) feststellen (Abb. 14).



**Abbildung 14: Immunhistochemische Färbung von cASCs und caninem Hirngewebe mit den Neuronen-spezifischen Antikörpern MAP2 und  $\beta$ -III-Tubulin.** (A-C) Expression von MAP2 im (A) Hirngewebe, in (B) undifferenzierten cASCs, in (C) neuronal differenzierten cASCs. (D-F) Expression von  $\beta$ -III-Tubulin im (D) Hirngewebe, in (E) undifferenzierten cASCs, in (F) neuronal differenzierten cASCs. Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI.

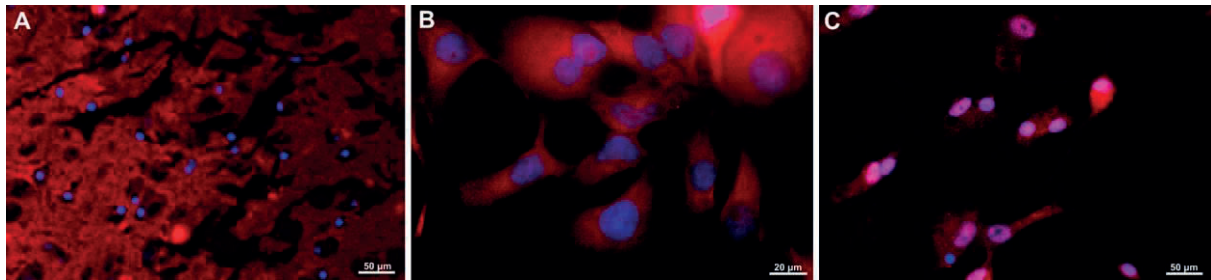
Die Expression der glialen Marker A2B5 und GFAP konnte im Hirngewebe detektiert werden (Abb. 15A und D). Auch die undifferenzierten cASCs zeigten teilweise eine leichte Expression dieser Marker (Abb. 15B und E). In den differenzierten Zellen war die Expression von A2B5 und GFAP stärker, ließ sich aber nicht in jeder Zelle feststellen (Abb. 15C und F).



**Abbildung 15: Immunhistochemische Färbung von cASCs und caninem Hirngewebe mit den Glia-spezifischen Antikörpern A2B5 und GFAP.** (A-C) Expression von A2B5 im (A) Hirngewebe, in (B) undifferenzierten cASCs, in (C) neuronal differenzierten cASCs. (D-F) Expression von GFAP im (D) Hirngewebe, in (E) undifferenzierten cASCs, in (F) neuronal differenzierten cASCs. Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI.

Die Expression von Nestin, einem Marker für neurale Progenitorzellen, konnte im Hirngewebe des Hundes und ebenso in den undifferenzierten und differenzierten cASCs beobachtet werden (Abb. 16). Hierbei fiel auf, dass sich die Lokalisation der Expression vor allem auf das Zytoplasma der Zellen konzentrierte.





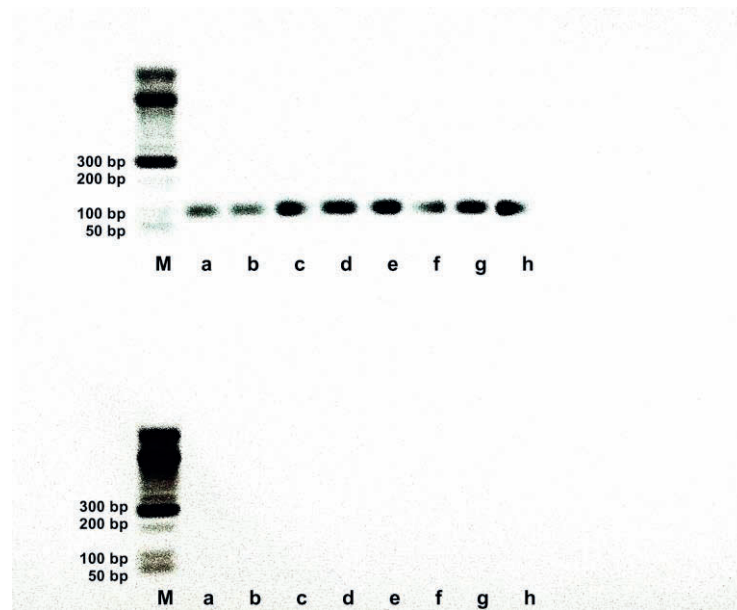
**Abbildung 16: Immunhistochemische Färbung von cASCs und caninem Hirngewebe mit dem Antikörper Nestin.** (A-C) Expression von Nestin im (A) Hirngewebe, in (B) undifferenzierten cASCs, in (C) neuronal differenzierten cASCs. Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI.

#### 4.2.3 Molekularbiologische Ergebnisse

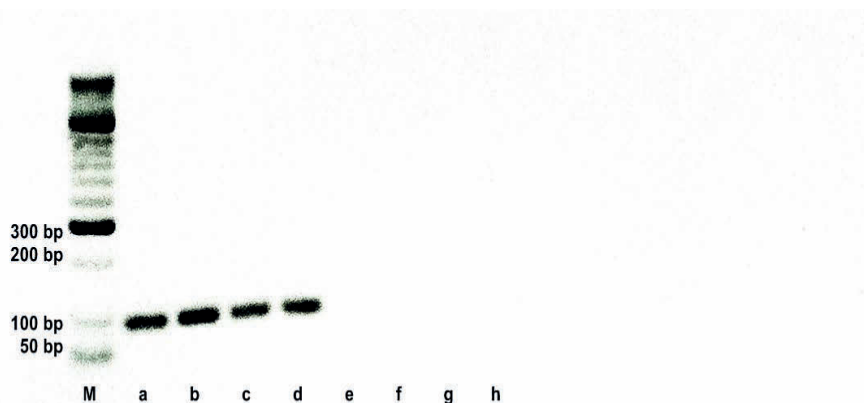
Mittels qRT-PCR wurde die Expression der neuronalen Differenzierungsmarker MAP2,  $\beta$ -III-Tubulin, Nestin und GFAP untersucht. Ebenfalls erfolgte eine Analyse des Expressionsmusters der Neurotrophine NGF, BDNF und GDNF. Die qRT-PCR wurde mittels der CFX<sup>TM</sup>Manager Software 2.0 (Bio-Rad) ausgewertet und zusätzlich anhand einer Schmelzkurvenanalyse überprüft. Die endgültigen Werte ergeben sich aus den Mittelwerten von insgesamt neun untersuchten Spendern.

##### 4.2.3.1 Überprüfung der PCR-Produkte in der Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der Reinheit der gewonnenen cDNA-Proben wurde eine RT-PCR mit dem Ziel-Gen GAPDH durchgeführt. Die auf einem Agarosegel aufgetragenen PCR-Proben wurden mittels Elektrophorese aufgetrennt und auf GAPDH-spezifische Banden untersucht. Für weitere qRT-PCR-Untersuchungen wurden nur Proben verwendet, die solche positiven Banden und keine Banden im (-)RT-Ansatz aufwiesen. Die Abbildungen 17 und 18 zeigen anhand dreier Spender exemplarisch die Ergebnisse der qualitativen RT-PCR.



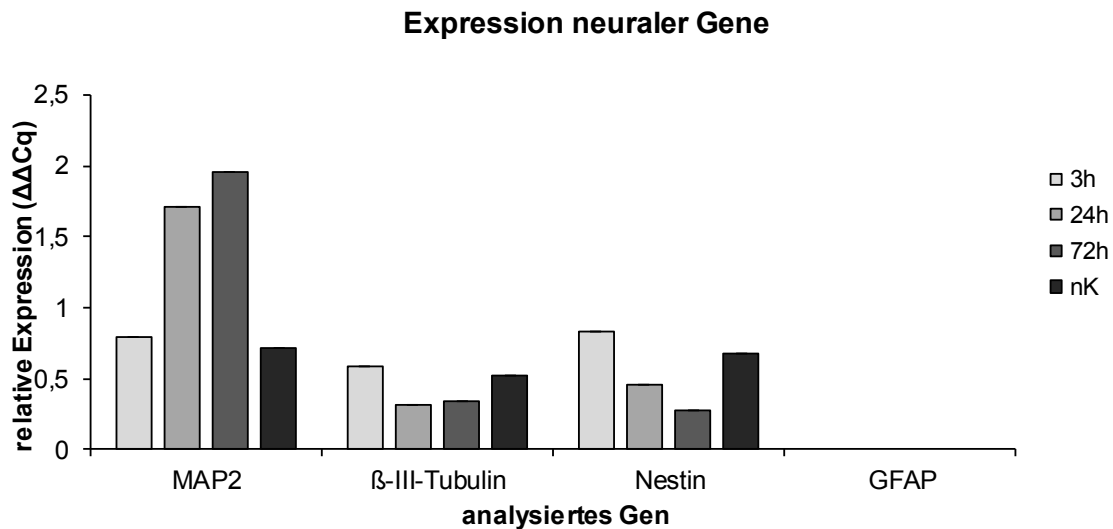
**Abbildung 17: Gelelektrophorese im Anschluss der GAPDH-RT-PCR.** Obere Reihe: Proben des (+)RT-Ansatzes, untere Reihe: Proben des (-)RT-Ansatzes. a-d: PCR-Produkte von Hd 12/15 a: 3h neuronale Differenzierung, b: 24h neuronale Differenzierung, c: 72h neuronale Differenzierung, d: Negativkontrolle; e-h: PCR-Produkte von Hd 129/10 e: 3h neuronale Differenzierung, f: 24h neuronale Differenzierung, g: 72h neuronale Differenzierung, h: Negativkontrolle. M: Marker, bp: Basenpaare.



**Abbildung 18: Gelelektrophorese im Anschluss der GAPDH-RT-PCR.** a-d: Proben des (+)RT-Ansatzes, a: 3h neuronale Differenzierung, b: 24h neuronale Differenzierung, c: 72h neuronale Differenzierung, d: Negativkontrolle; PCR-Produkte von Hd 2/14, e-h: Proben des (-)RT-Ansatzes PCR-Produkte von Hd 2/14. M: Marker, bp: Basenpaare.

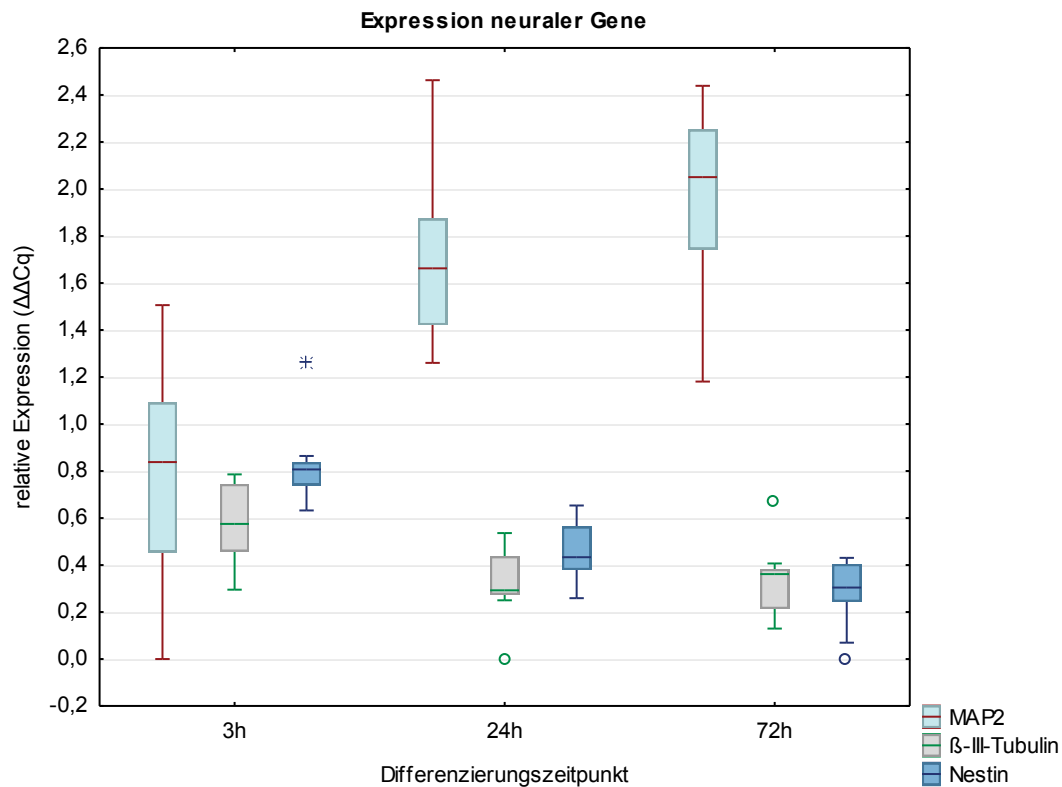
#### 4.2.3.2 Expression neuronaler und glialer Marker

Die Abbildung 19 zeigt die relative Expression ( $\Delta\Delta Cq$ ) der neuronalen Differenzierungsmarker im Verlauf der neuronalen Expression inklusive der dazugehörigen Negativkontrollen. Hierbei sind die mRNA-Expressionen aller Spenderindividuen zusammengefasst.



**Abbildung 19:** Expression der neuronalen Differenzierungsmarker MAP2,  $\beta$ -III-Tubulin, Nestin und GFAP im Differenzierungsverlauf mit Negativkontrollen (nK).

Bei Anblick der Expressionsmuster der untersuchten Gene fällt auf, dass zu keinem Zeitpunkt der neuronalen Differenzierung eine GFAP-Expression nachgewiesen werden konnte. Ebenso konnte kein Nachweis von GFAP in den undifferenzierten cASCs erfolgen (Abb. 19). Es fällt auf, dass bei allen restlichen untersuchten Genen eine mRNA-Expression bereits in den undifferenzierten Zellen zu erkennen ist. Demnach exprimieren cASCs auch ohne neuronale Induktion neuronale Gene. Die MAP2-Expression steigt im Verlauf der Differenzierung an und ist 3h nach Start der Differenzierung höher als in den undifferenzierten Zellen. Die höchste Expression von MAP2 ist nach 72h zu erkennen.  $\beta$ -III-Tubulin zeigt die höchste Expression nach 3h neuronaler Differenzierung, sinkt nach 24h und steigt nach zwei weiteren Tagen kaum an. Die Nestin-Expression nimmt im Laufe der Differenzierung ab und ist nach 72h schwächer als in den undifferenzierten Zellen. Insgesamt lässt sich anhand der Ergebnisse erkennen, dass MAP2 am stärksten in den differenzierten Zellen exprimiert wird (Abb. 20).

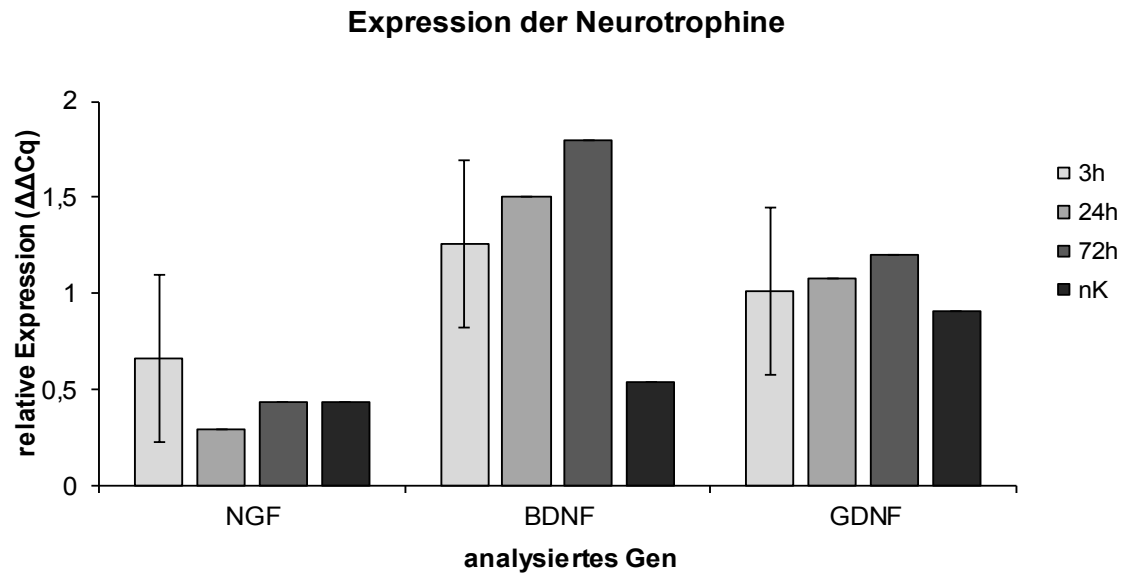


**Abbildung 20:** Expression der Differenzierungsmarker MAP2, β-III-Tubulin und Nestin in neuronal differenzierten cASCs im Differenzierungsverlauf.

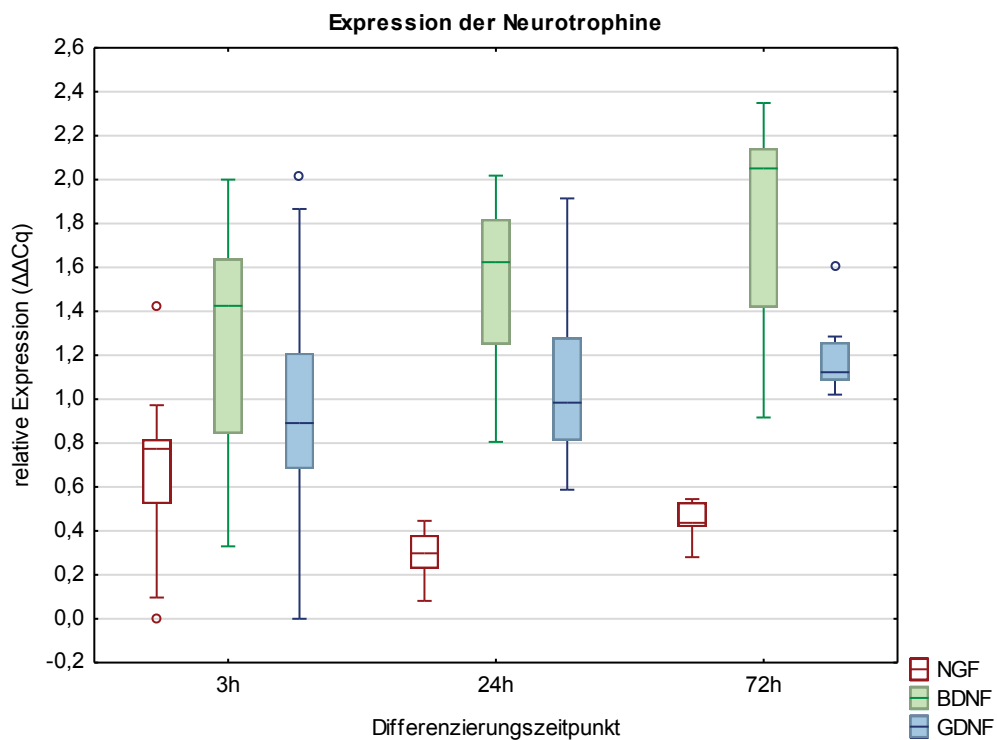
#### 4.2.3.3 Expression der Neurotrophine

Alle untersuchten Neurotrophine konnten in den differenzierten sowie in den undifferenzierten Zellen nachgewiesen werden.

Die NGF-Expression ist zum Zeitpunkt 3h am stärksten und sinkt nach 24h ab (Abb. 21). Nach zwei weiteren Tagen steigt die Expression leicht an und ähnelt der Expressionsstärke von NGF in undifferenzierten cASCs. BDNF wird von allen Neurotrophinen am stärksten in den neuronal differenzierten Zellen exprimiert (Abb. 22). Hier steigt die Expression im Differenzierungsverlauf stetig an. In undifferenzierten cASCs wird BDNF schwächer exprimiert als in differenzierten Zellen (Abb. 21). Die GDNF-Expression steigt im Verlauf der Differenzierung langsam an. GDNF wird in undifferenzierten cASCs ähnlich stark wie in differenzierten Zellen zu Beginn der Differenzierung exprimiert (Abb. 21).



**Abbildung 21:** Expression der Neurotrophine NGF, BDNF und GDNF im Differenzierungsverlauf mit Negativkontrollen (nK).

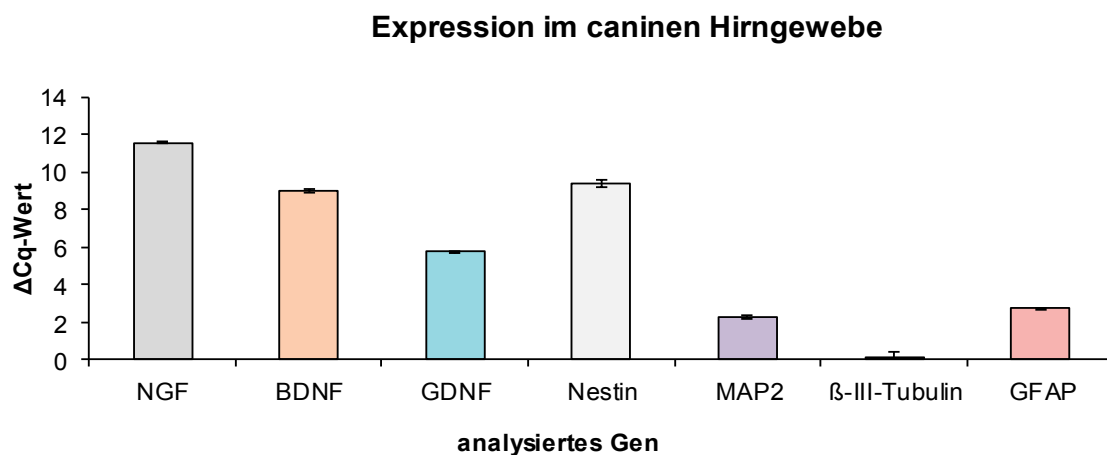


**Abbildung 22:** Expression der Neurotrophine NGF, BDNF und GDNF im Differenzierungsverlauf.



#### 4.2.3.4 Expression der Marker im caninen Hirngewebe

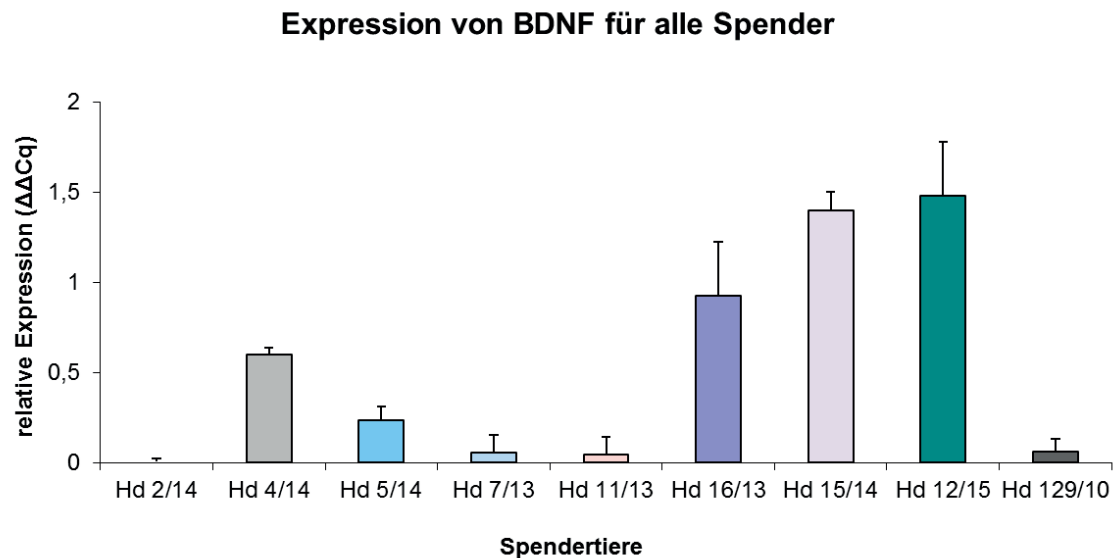
Als Positivkontrolle der neuronalen Differenzierung diente Hirngewebe eines Border Collies. Anhand der Ergebnisse der qRT-PCR kann gezeigt werden, dass alle Neurotrophine sowie die neuronalen Gene im Gehirn des Hundes exprimiert werden. Auch für GFAP, welches weder in differenzierten noch in undifferenzierten cASCs nachgewiesen werden konnte, ist eine deutliche Expression zu erkennen. Der neurotrophe Faktor NGF wird im untersuchten Gewebe am stärksten exprimiert, während der späte neuronale Marker MAP2 schwächer und der frühe neuronale Marker  $\beta$ -III-Tubulin kaum exprimiert werden (Abb. 23).



**Abbildung 23:** Expression aller untersuchten Marker im caninen Hirngewebe.

#### 4.2.3.5 Expressionsunterschiede zwischen Spenderindividuen

Um aufzuzeigen, dass es zwischen den Zellen der einzelnen Spendertiere große Unterschiede in ihren Expressionsmustern für die neuronalen Gene gibt, wurden die Daten der untersuchten Hunde exemplarisch für BDNF gegenübergestellt und analysiert. Hierfür wurden die Daten der differenzierten Zellen zum Zeitpunkt 72h verwendet. Es ist zu erkennen, dass in den Zellen eines Spendertiers keine BDNF-Expression nachgewiesen werden kann, während andere Spender eine deutliche Expression von BDNF zeigen (Abb. 24).



**Abbildung 24:** Expression von BDNF für ASCs aller neun Spender zum Zeitpunkt 72h nach neuronaler Differenzierung.

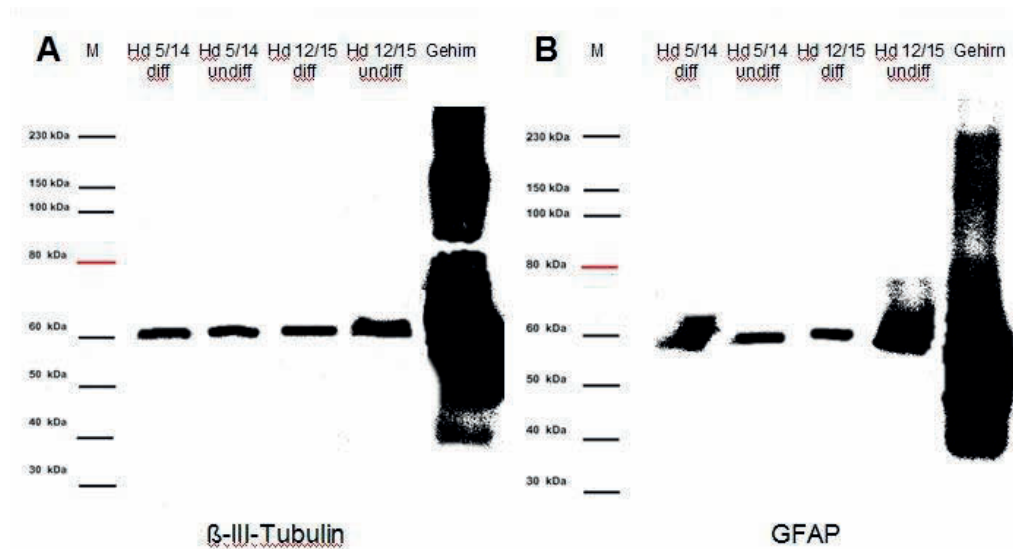
#### 4.2.3.6 Ergebnisse des Western Blots

In Abbildung 25 sind die Ergebnisse der Proteinexpression für den neuronalen Marker  $\beta$ -III-Tubulin sowie den glialen Marker GFAP exemplarisch dargestellt. Um die Ergebnisse des Western Blots genau darzustellen, wurden die Proteinbanden zuvor über einen ebenfalls durchgeführten  $\beta$ -Actin-Blot mithilfe des Li-COR „Odyssey“ normalisiert.

Beide Marker ließen sich in differenzierten und undifferenzierten cASCs sowie im caninen Hirngewebe nachweisen. Bei  $\beta$ -III-Tubulin ist zu erkennen, dass in undifferenzierten Zellen des Hundes Hd 12/15 mehr Protein translatiert wurde als in den differenzierten Zellen desselben Spenders (Abb. 25A). Die Banden für differenzierte und undifferenzierte cASCs des Hundes Hd 5/14 zeigen keinen deutlichen Unterschied bezüglich ihrer Intensität. So lässt sich ein Unterschied in der  $\beta$ -III-Tubulin-Proteintranslation zwischen beiden Hunden feststellen.

Der gliale Marker GFAP wurde in den differenzierten Zellen des Spenders Hd 5/14 stärker translatiert als in den neuronal differenzierten Zellen, während bei Hd 12/15 die differenzierten Zellen eine stärkere Bande zeigen (Abb. 25B).

Die Antikörper für die Marker MAP2 (300 kDa), Nestin (200-260 kDa) konnten aufgrund ihrer zu großen Masse nicht erfolgreich im Western Blot getestet werden.



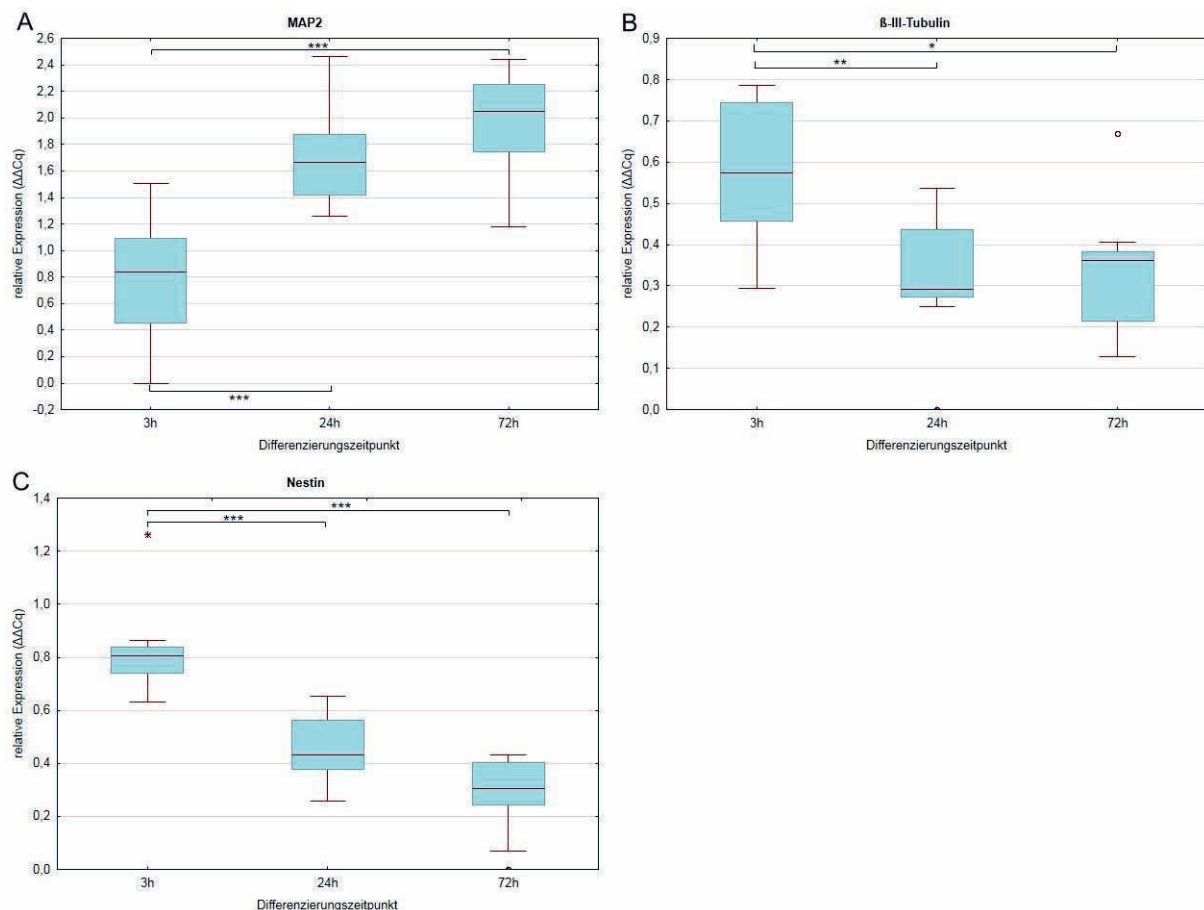
**Abbildung 25:** Western Blot der Marker  $\beta$ -III-Tubulin (A) und GFAP (B) für die Spender Hd 5/14, Hd 12/15 und canines Hirngewebe.

## 4.3 Statistische Ergebnisse

### 4.3.1 Expressionsmuster im Differenzierungsverlauf

Bei Betrachtung der Genexpression für MAP2 fällt auf, dass es signifikante Unterschiede in der Expressionsstärke während des Differenzierungsverlaufs gibt (Abb. 26A). So steigt die Expression zwischen 3h und 24h signifikant ( $p=0,001$ ) an. Nach 72h neuronaler Differenzierung erreicht die Expression ihre höchsten Werte, allerdings ist der Anstieg im Vergleich zum Zeitpunkt 24h nicht signifikant unterschiedlich (Tab. 19).

Der späte neuronale Marker  $\beta$ -III-Tubulin zeigt nach 3h seine höchste Expression, die nach 24h signifikant sinkt ( $p=0,006$ ) (Abb. 26B). 72h nach Differenzierungsbeginn sinkt die Expression von  $\beta$ -III-Tubulin erneut, der Unterschied zum Zeitpunkt 24h ist jedoch nicht signifikant (Tab. 19). Zwischen den Expressionswerten zu den Zeitpunkten 3h und 72h kann ein signifikanter Unterschied festgestellt werden ( $p=0,012$ ). Die Nestin-Expression verhält sich ähnlich wie das Expressionsmuster von  $\beta$ -III-Tubulin. 3h nach neuronaler Induktion lässt sich die höchste Expression feststellen, die im weiteren Verlauf der Differenzierung sinkt (Abb. 26C). Hierbei lässt sich zwischen den Zeitpunkten 3h und 24h ein signifikanter Abstieg der Expression feststellen ( $p=0,000$ ). Nestin wird nach 72h geringer exprimiert als nach 24h, dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant (Tab. 19).

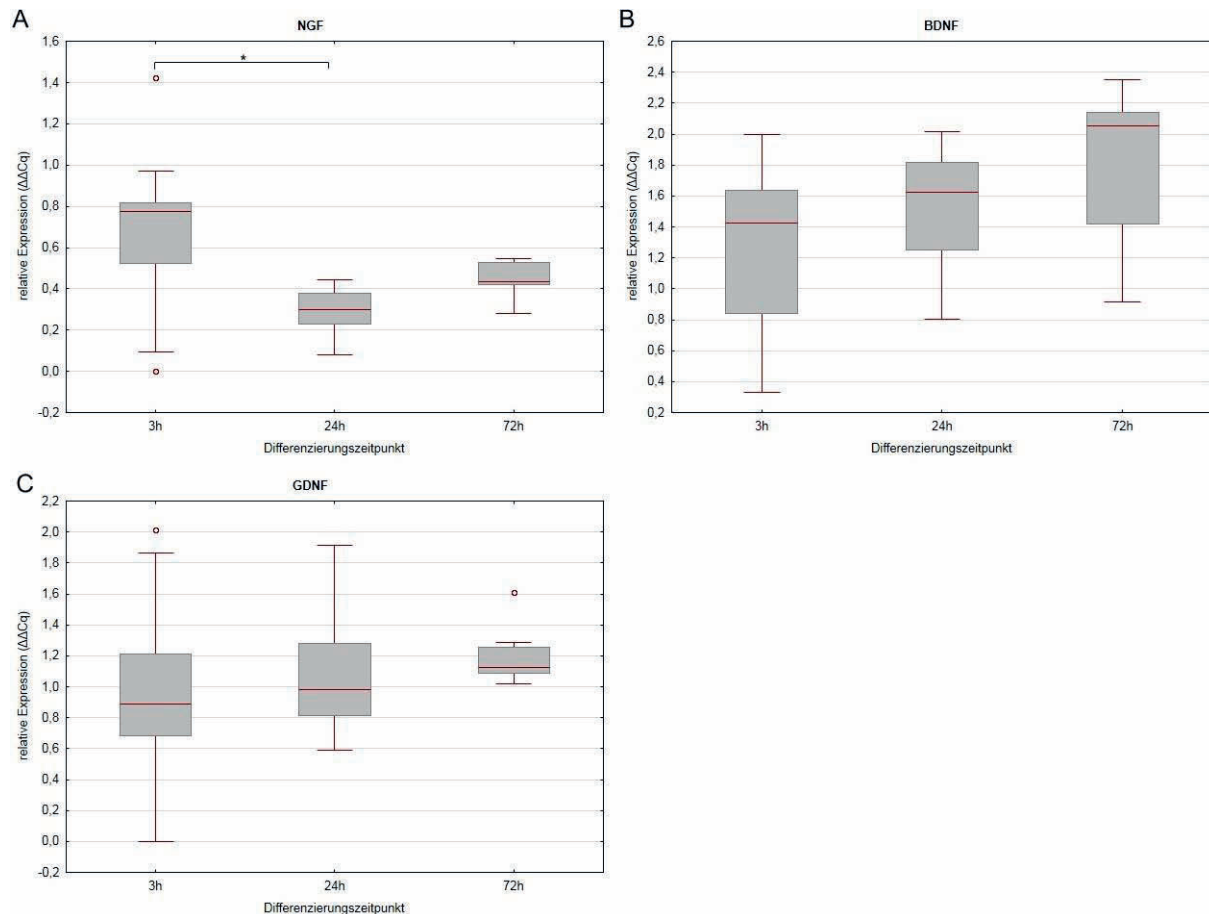


**Abbildung 26:** Expression der Marker (A) MAP2, (B)  $\beta$ -III-Tubulin und (C) Nestin im Differenzierungsverlauf mit Signifikanzlevel (\* : 5%-Level, \*\* : 1%-Level, \*\*\* : 0,1%-Level).

**Tabelle 19:** p-Werte für die Marker MAP2,  $\beta$ -III-Tubulin und Nestin im Differenzierungsverlauf.

MAP2	3h	24h	72h	$\beta$ -III-Tubulin	3h	24h	72h	Nestin	3h	24h	72h
3h		0,001	0,000	3h		0,006	0,012	3h		0,000	0,000
24h	0,001		0,496	24h	0,006		0,959	24h	0,000		0,056
72h	0,000	0,496		72h	0,012	0,959		72h	0,000	0,056	

Die Expression von NGF zeigt keinen stetigen An- oder Abstieg im Laufe der neuronalen Differenzierung. Die stärkste Expression zeigt sich 3h nach Induktionsbeginn (Abb. 27A). Nach 24h sinkt die NGF-Expression ab, der Unterschied zum ersten Zeitpunkt ist hierbei signifikant ( $p=0,02$ ). Anschließend steigt die Expression wieder leicht an. Die weiteren Neurotrophine BDNF und GDNF weisen im Differenzierungsverlauf keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Untersuchungszeitpunkten (Tab. 20).



**Abbildung 27:** Expression der Neurotrophine (A) NGF, (B) BDNF und (C) GDNF im Differenzierungsverlauf mit Signifikanzlevel (\* : 5%-Level.)

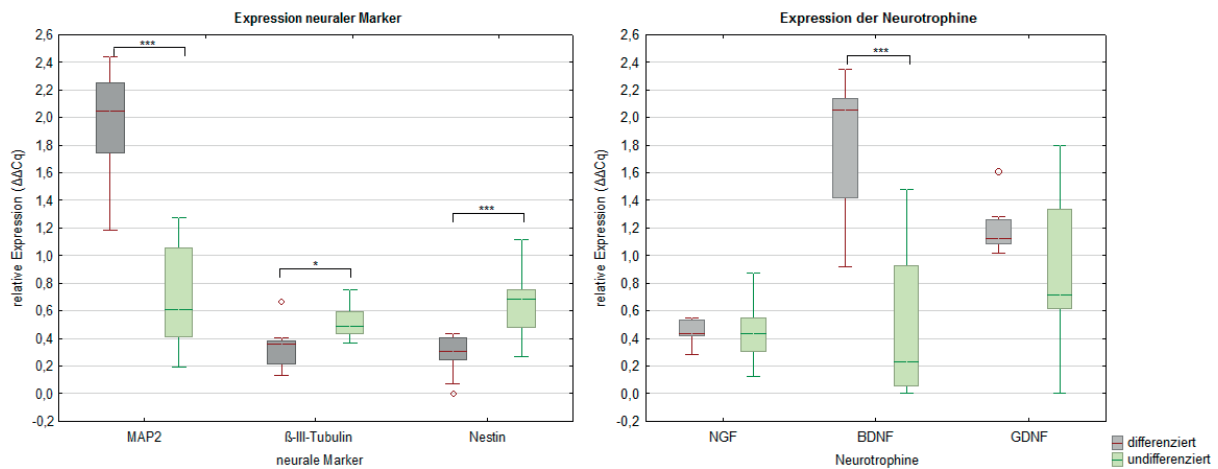
**Tabelle 20:** p-Werte für die Marker NGF, BDNF und GDNF im Differenzierungsverlauf.

NGF	3h	24h	72h	BDNF	3h	24h	72h	GDNF	3h	24h	72h
3h		0,020	0,202	3h		0,536	0,066	3h		0,949	0,656
24h	0,019		0,489	24h	0,536		0,416	24h	0,949		0,835
72h	0,202	0,489		72h	0,066	0,416		72h	0,656	0,835	

#### 4.3.2 Expression neuronaler Marker in differenzierten und undifferenzierten cASCs

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Genexpression für jeden untersuchten neuronalen Marker im Vergleich zwischen differenzierten und undifferenzierten cASCs dargestellt. MAP2 wird in den differenzierten Zellen signifikant höher exprimiert als in den undifferenzierten Zellen ( $p=0,0007$ ) (Abb. 28).  $\beta$ -III-Tubulin und Nestin hingegen zeigen eine signifikant höhere Expression in den undifferenzierten cASC ( $\beta$ -III-Tubulin  $p=0,015$ ; Nestin  $p=0,001$ ). Bei Betrachtung der Neurotrophin-Expression lässt sich erkennen, dass BDNF eine signifikant höhere Expression in den neuronal differenzierten Zellen aufweist ( $p=0,001$ ), während sich

die Expressionen von NGF und GDNF in differenzierten und undifferenzierten cASCs nicht signifikant voneinander unterscheiden (Abb. 28 und Tab. 21).



**Abbildung 28:** Expression der neuronalen Gene (A) und Neurotrophine (B) in differenzierten und undifferenzierten Zellen mit Signifikanzlevel (\* : 5%-Level, \*\* : 1%-Level, \*\*\* : 0,1%-Level)..

**Tabelle 21:** p-Werte für die untersuchten Marker im Vergleich zwischen differenzierten und undifferenzierten cASCs. (MW: Mittelwert, Stabw: Standardabweichung).

Gen	MW differenziert	Stabw differenziert	MW undifferenziert	Stabw undifferenziert	p-Wert
NGF	0,436	0,101	0,434	0,222	0,983
BDNF	1,802	0,48	0,533	0,599	<b>0,001</b>
GDNF	1,196	0,182	0,907	0,585	0,176
MAP2	1,955	0,430	0,709	0,377	<b>0,0007</b>
β-III-Tubulin	0,34	0,159	0,519	0,117	<b>0,015</b>
Nestin	0,278	0,152	0,673	0,265	<b>0,001</b>

## 5. Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass canine ASCs unter bestimmten Bedingungen in Zellen mit einer neuronalen Morphologie und neuronalen Genexpression induziert werden können. Mehrere Studien belegten bereits die Fähigkeit von humanen BMSCs, sich in Neuronen-ähnliche Zellen zu differenzieren (Woodbury et al. 2002; Kamishina et al. 2006; Sanchez-Ramos et al. 2000, Deng et al. 2001). Daneben existieren nur wenige Veröffentlichungen, die solch eine neuronale Differenzierung in caninen BMSCs oder Zellen aus Amnionflüssigkeit beschreiben (Kamishina et al. 2006; Edamura et al. 2012; Kim et al. 2014). Eine noch geringere Anzahl von Studien befasst sich mit dem neuronalen Differenzierungspotenzial von caninen ASCs. Hier existiert bislang nur eine Vergleichsstudie, die die neuronale Differenzierung in cBMSCs und cASCs untersucht (Chung et al. 2013). Somit zeigt die vorliegende Arbeit, als eine der Wenigen, die Fähigkeit von cASCs, sich in Neuronen-ähnliche Zellen zu differenzieren.

### 5.1 Diskussion der Methode

Die Differenzierung von Stammzellen in Zellen unterschiedlicher Gewebe gehört zur zellbiologischen Grundlagenforschung im Einsatz von Stammzellen bei Erkrankungen. Des Weiteren ist die Fähigkeit zur Differenzierung in verschiedene Richtungen eine Voraussetzung für Zellen, um sie als Stammzellen zu definieren (Dominici et al. 2006). Hierfür werden vor allem die adipogene, chondroge und osteogene Differenzierung verwendet. Im Bereich der Therapieeinsatzmöglichkeiten bei verschiedenen Erkrankungen wird aber vor allem auch die Differenzierung von Stammzellen in eine myogene und neuronale Richtung untersucht.

Es existieren viele verschiedene Differenzierungsprotokolle für eine neuronale Differenzierung von Stammzellen. Das hier in der vorliegenden Arbeit verwendete Protokoll stammt aus der Veröffentlichung von Safford et al. aus dem Jahr 2002. Diese Arbeitsgruppe differenzierte murine und humane Stammzellen aus dem Fettgewebe in eine neuronale Linie. Aufgrund dieses Protokolls konnte bereits nach einer bis drei Stunden eine veränderte Morphologie der Stammzellen festgestellt werden (Safford et al. 2002). Ebenfalls gelang der Nachweis einer positiven immunhistochemischen Färbung für die Marker GFAP, Nestin und NeuN. Auf molekularbiologischer Ebene zeigten die Ergebnisse des Western Blots eine gestiegene Expression von GFAP, Nestin und NeuN. Aufgrund dieser Ergebnisse und aufgrund der Tatsache, dass keine neuronalen Faktoren und auch keine Wachstumsfaktoren

wie EGF oder FGF zum Differenzierungsmedium hinzugegeben wurden, wurde in der vorliegenden Arbeit mit dem Differenzierungsprotokoll von Safford et al. (2002) gearbeitet.

### 5.1.1 Zusätze des neuronalen Mediums

Zu den Bestandteilen des hier verwendeten neuronalen Differenzierungsmediums gehörten Kaliumchlorid, Forskolin, Insulin, Valproinsäure, Butylhydroxyanisol und Hydrocortison.

Bei Hydrocortison handelt es sich um einen Wirkstoff aus der Gruppe der Glucocorticoide, zu der auch Dexamethason und Betamethason gehören (Ninomiya et al. 2014). Glucocorticoide werden vor allem in der Behandlung gegen bronchopulmonale Dysplasie eingesetzt (Halliday et al. 2009). In einer Studie fanden Ninomiya et al. heraus, dass der Einsatz von Glucocorticoiden die Proliferation von neuronalen Vorläuferzellen, die von human-induzierten pluripotenten Stammzellen abgeleitet wurden, erhöht (Ninomiya et al. 2014). Ebenso stieg unter dem Einfluss von Hydrocortison die Anzahl an MAP2-positiven neuronalen Vorläuferzellen. Der Gebrauch von Dexamethason im Einsatz gegen Krankheiten führt allerdings oft zu schädlichen Effekten am zentralen Nervensystem (Murphy et al. 2001). Deswegen wurde Hydrocortison als präferiertes Glucocorticoid für weitere neuronale Studien angesehen (Ninomiya et al. 2014).

Forskolin gehört zur Gruppe der Diterpene und stimuliert die Adenylatcyclase in geschädigten, aber auch intakten Zellen. Die Stimulation der Adenylatcyclase führt zu einem Anstieg von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) innerhalb der Zellen (Seamon und Daly 1981). Lepski et al. konnten zeigen, dass eine Erhöhung von cAMP durch Forskolin zu einer erleichterten neuronal-funktionellen Reifung von neuronalen Stammzellen führt (Lepski et al. 2013). Auch Fujioka et al. konnten in Versuchen mit neuronalen Stammzellen feststellen, dass ein durch Forskolin induzierter Anstieg von cAMP zu einem Anstieg in der Länge und Anzahl von Dendritenverzweigungen und in der Anzahl von MAP2-positiven Zellen führt (Fujioka et al. 2004).

Bei Valproinsäure (2propylpentanoic-acid, VPA) handelt es sich um einen antiepileptischen und krampflösenden Wirkstoff, der eine hemmende Wirkung auf Klasse I Histon-Deacetylasen hat (englisch: class I histone deacetylases, HDACs) (Gottlicher et al. 2001). Die Histon-Acetylierung korreliert mit der Genaktivierung, Modifizierungen der Histone können die Interaktion zwischen Histonen und DNA und somit die Regulierung der Genexpression beeinflussen (Jenuwein und Allis 2001; Hsieh et al. 2004). Als Hemmstoff dieser HDACs stellt Valproinsäure ein gutes Mittel für die Untersuchung der Assoziation zwischen Chromatinmodifizierungen und der Determination des Zellschicksals dar. Hsieh et al. konnten im Rattenmodell zeigen, dass Valproinsäure die Differenzierung von neuronalen



Vorläuferzellen des Hippocampus in Neurone fördert, jedoch die gliale Differenzierung hemmt (Hsieh et al. 2004). Andere Studien belegen einen förderlichen Einfluss von VPA auf die Zelldifferenzierung sowie auf das Wachstum und die Elongation von Neuriten in neuronalen Stammzellen (Jung et al. 2008; Lv et al. 2012). Kurihara et al. untersuchten den Einfluss von Valproinsäure auf neuronal differenzierte canine Stammzellen aus dem Fettgewebe (Kurihara et al. 2014). Sie konnten zeigen, dass Valproinsäure die Proliferation von cASCs hemmt, die neuronale Differenzierung dieser Zellen allerdings fördert. Ebenso wurde der Einfluss von VPA auf die adipogene und osteogene Differenzierung untersucht, hierbei konnte festgestellt werden, dass VPA die Ausbildung von Lipidvakuolen und Calciumeinlagerungen unterdrückt. Neben der Förderung der neuronalen Differenzierung, die morphologisch untersucht wurde, konnten Kurihara et al. ebenfalls zeigen, dass die Zellen durch die Induktion mit VPA eine Veränderung in ihrer Genexpression aufweisen. So kam es zu einem Anstieg der neuronalen Marker MAP2 und  $\beta$ -III-Tubulin. Die Expression des glialen Markers GFAP konnte hingegen weder in neuronal differenzierten noch in undifferenzierten ASCs nachgewiesen werden (Kurihara et al. 2014). Lv et al. stellten überdies hinaus auch eine Hochregulierung von BDNF in VPA-induzierten Zellen und somit eine verstärkte neuronale Reifung wie auch ein verbessertes Neuritenwachstum dar (Lv et al. 2012). In einer neueren Studie konnten Okubo et al. nachweisen, dass der Einsatz von VPA die neuronale Differenzierung von ASCs aus Ratten durch Acetylierung des Histons H3 fördert (Okubo et al. 2016).

Bei Insulin handelt es sich um ein Protein, das primär in den  $\beta$ -Zellen der Bauchspeicheldrüse gebildet wird. Es hat einen kontrollierenden Einfluss auf den Metabolismus und das Wachstum von fetalen Gehirnzellen in Kultur (Tanaka et al. 1995). Weiterhin spielt es eine Rolle bei der neuronalen Proliferation und Degeneration, Apoptose, synaptischen Übertragung sowie bei Erinnerungs- und Lernprozessen (Schubert et al. 2004). Insulin fördert das Wachstum der Neuriten, die Formation der Synapsen und das Überleben von Nervenzellen und fungiert als Signalmolekül in neurodegenerativen Erkrankungen (Nelson und Alkon 2005). In Versuchen zum Einfluss von Insulin auf neuronale Zellen konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von Insulin zu Zellen in Kultur einen positiven Effekt auf das Zellwachstum (Aizenman et al. 1986; Aizenman und Vellis 1987), das Neuritenwachstum (Puro und Agardh 1984) und die Zelldifferenzierung (Aizenman und Vellis 1987) hat.

Butylhydroxyanisol ist ein Antioxidant aus der Gruppe der Phenolether. Wang und Ding konnten den induzierenden Einfluss von BHA auf die neuronale Differenzierung von humanen Zellen aus Nabelschnurblut zeigen (Wang und Ding 2013). 12 Stunden nach Zugabe von BHA stellten sie eine veränderte Zellmorphologie fest. Nach 24 Stunden neuronaler Induktion konnte mittels qRT-PCR die Expression von Nestin und MAP und anhand immunhistochemischer Analyse die Expression von Nestin, GFAP und NSE

nachgewiesen werden (Wang und Ding 2013). Zhang et al. gelang durch die Anwendung von BHA die neuronale Differenzierung von Fibroblasten. NF-L und Nestin zeigten in dieser Studie positive Expressionen in der immunhistologischen Untersuchung (Zhang et al. 2012).

### 5.1.2 Der Hund als Stammzellspender

Im Gegensatz zu Labortieren wie Mäusen und Ratten handelt es sich bei Hunden oftmals um Tiere, die verschiedenen Umweltbedingungen ausgesetzt sind (Volk et al. 2012). Diese können zu unterschiedlichen Krankheiten wie Krebs, Adipositas oder traumatischen Verletzungen führen. Aufgrund dieser Tatsachen kann es selbstverständlich zu individuellen Unterschieden bezüglich der Biologie der MSCs kommen, da nicht alle Spender unter gleichen Bedingungen gehalten werden.

Volk et al. untersuchten an 18 Mischlingshunden die Auswirkungen des Spenderalters, den Einfluss der Entnahmestelle am Körper für die Gewebespende und die Höhe der Zellpassage auf die Differenzierungsfähigkeit von mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark (Volk et al. 2012). Die Ergebnisse zeigten, dass das Alter der Tiere eine große Rolle bei der Differenzierungskapazität der Stammzellen spielt. So gab es einen signifikanten Unterschied zwischen jüngeren und älteren Hunden zulasten des höheren Alters im Hinblick auf das Potenzial, in eine osteogene Linie zu differenzieren. Dies konnte anhand der Mineralisierung der Zellen, der Aktivität der alkalischen Phosphatase und der mRNA-Expression für osteogene Differenzierungsmarker aufgezeigt werden (Volk et al. 2012). Dieses Ergebnis ähnelt anderen Studien mit humanen und murinen MSCs, in denen ebenfalls eine geringere Differenzierungsfähigkeit von MSCs älterer Spender festgestellt werden konnte (Roura et al. 2006; Zheng et al. 2007). Bei Volk et al. ließ sich weiterhin feststellen, dass Zellen aus dem Humerus, im Gegensatz zu Zellen aus Ilium, Tibia und Femur, das geringste osteogene Differenzierungspotenzial aufweisen (Volk et al. 2012). Die Ergebnisse der Untersuchung zum Differenzierungspotenzial in unterschiedlichen Zellpassagen zeigten, dass die Zellen bereits in Passage 3 eine verringerte Fähigkeit zur osteogenen Differenzierung aufweisen (Volk et al. 2012).

Anhand all dieser Studien lässt sich diskutieren, ob Spender, Zellpassage und auch Zellemdium einen Einfluss auf die Differenzierungsfähigkeit caniner Stammzellen haben.

### 5.1.3 Einfluss der Spender auf das Differenzierungspotenzial von cASCs

Die Fähigkeit zur Differenzierung in verschiedene Gewebe, die Expressionsmuster von Oberflächenmarkern und Transkriptionsfaktoren sowie die Proliferation und Migration von Stammzellen unterscheiden sich von Spezies zu Spezies. Allerdings lassen sich nicht nur Unterschiede zwischen verschiedenen Spezies, sondern auch zwischen einzelnen Individuen einer Spezies feststellen. Vor allem bei der Isolierung, Kultivierung und weitergehenden Erforschung von caninen Stammzellen fällt auf, dass sich die Zellen verschiedener Spender oftmals unterschiedlich verhalten.

Betrachtet man die Expression der Zelloberflächenmarker für Stammzellen, so konnten bisher unterschiedliche Ergebnisse erzielt werden. Während Vieira et al. den eigentlich für Stammzellen negativen Oberflächenmarker CD117 in cASCs nicht nachweisen konnten, erschien dieser Marker bei Martinello et al. in einer positiven Expression (Martinello et al. 2011). Neupane et al. konnten in cASCs die Expression der Transkriptionsfaktoren SOX2, OCT4 und NanoG feststellen, während Martinello et al. nur der Nachweis des Faktors SOX2 gelang (Neupane et al. 2008; Martinello et al. 2011).

Es ist von großer Bedeutung, die biologischen Eigenschaften der Zellen zu kennen, da diese sowohl in der Veterinärmedizin zur Zell-basierten Behandlung als auch in präklinischen Studien für die Humanmedizin zum Einsatz kommen sollen.

### 5.1.4 Einfluss des Kultivierungsmediums auf cASCs

Kim et al. untersuchten den Einfluss von zwei verschiedenen Kulturmedien auf canine mesenchymale Stammzellen aus dem Fettgewebe, die als Spenderzellen in der Zellkerntransfusion eingesetzt werden sollten (Kim et al. 2014). cASCs wurden zum einen in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) und zum anderen in RCMEP (Keratinocyte-SFM based medium) kultiviert. Die in RCMEP-Medium kultivierten Zellen zeigten eine signifikant höhere Expression der Transkriptionsfaktoren SOX2, OCT4 und NanoG als die in DMEM kultivierten Zellen (Kim et al. 2014). Auch Kiefer et al. beschäftigten sich mit dem Einfluss verschiedener Medien auf den Phänotyp von cASCs (Kiefer et al. 2014). Sie testeten unter anderem das Differenzierungspotenzial der Zellen, die vorher jeweils in einem von fünf unterschiedlichen Medien kultiviert wurden. Hierbei konnte festgestellt werden, dass das Kultivierungsmedium einen Einfluss auf die Differenzierungsfähigkeit der Zellen hatte. So konnten beispielsweise Zellen, die in BGM (basic cell growth medium) kultiviert wurden, zur Differenzierung in eine adipogene, chondrogene und osteogene Linie induziert werden. Zellen, die hingegen den Medien KNAC (Keratinocyte N acetyl-L-cystein supplemented

medium) und MAPC (Multipotent Adult Progenitor Cell Medium) ausgesetzt waren, zeigten hierbei ein verringertes Differenzierungspotenzial (Kiefer et al. 2014). Diese Ergebnisse belegen, dass bereits die Wahl und der Einsatz des Mediums zur Kultivierung und Vermehrung der mesenchymalen Stammzellen einen Einfluss auf ihr Differenzierungs- und Expressionspotenzial haben. Gründe für dieses unterschiedliche Verhalten der Zellen könnten deren Variabilität und Heterogenität innerhalb einer Stammzellpopulation sein. Auch Kiefer et al. diskutieren ihre Resultate mit den unterschiedlichen Eigenschaften von Stammzellen, die sich zwischen einzelnen Spezies und sogar zwischen Zellen derselben Herkunft finden können (Kiefer et al. 2014).

#### 5.1.5 Einfluss der Zellpassage auf cASCs

Nicht nur das Kultivierungsmedium kann einen Einfluss auf die mesenchymalen Stammzellen haben, ebenso spielen weitere Kulturbedingungen bei der Verwendung von Stammzellen eine Rolle. Vor allem in Anbetracht der Tatsache, dass Stammzellen eine klinische Anwendung haben, ist es von Bedeutung, dass sie ihre Eigenschaften und stammzelltypischen Fähigkeiten auch nach mehreren Passagen beibehalten. Bei Untersuchungen von Stammzellen aus dem Knochenmark konnte gezeigt werden, dass die Zellen ihr osteogenes Differenzierungspotenzial für 10 bis 15 Passagen beibehalten, die Kapazität zur adipogenen Differenzierung allerdings mit steigender Kulturdauer sinkt (Bruder et al. 1997; Digirolamo et al. 1999). In anderen Studien zur adipogenen und chondrogenen Differenzierung zeigten bovine ASCs bereits in Passage fünf ein niedriges Differenzierungspotenzial (Zhao et al. 2012). In einer Studie zur Untersuchung des Differenzierungspotenzials von caninen mesenchymalen Stammzellen aus dem Fettgewebe konnte gezeigt werden, dass die Expression von Oberflächenmarkern und Transkriptionsfaktoren in Zellen der Passagen eins bis sechs ohne große Unterschiede nachzuweisen ist (Lee et al. 2014). Allerdings wurde auch festgestellt, dass die adipogene und chondrogene Differenzierung von cASCs eine deutliche negative Korrelation mit einer steigenden Passage zeigte. Die Autoren schlossen daraus, dass höhere Passagen die multipotenten Eigenschaften der cASCs beeinflussen (Lee et al. 2014).

## 5.2 Diskussion der Ergebnisse

### 5.2.1 Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung der cASCs

Häufig diskutierte Probleme in der Forschung an Stammzellen sind die Vielzahl der Methoden zur Isolierung dieser Zellen und die Gewebearten, aus denen Stammzellen gewonnen werden können. Es ist oftmals schwierig, Ergebnisse verschiedener Studien miteinander zu vergleichen, wenn unterschiedliche Protokolle zur Isolierung und Kultivierung von mesenchymalen Stammzellen verwendet werden. Daher wurden „Minimal-Kriterien für mesenchymale Stammzellen“ formuliert (Dominici et al. 2006). Dazu zählen die Expression der Oberflächenmarker CD73, CD90 und CD105, die Plastik-Adhärenz der Zellen und die Fähigkeit zur Differenzierung in eine adipogene, chondrogene und osteogene Linie (Dominici et al. 2006; Chamberlain et al. 2007). Allerdings variiert das Expressionsmuster der Oberflächenmarker je nach Spezies und sogar je nach Individuum und ist des Weiteren abhängig von den Kulturbedingungen (Chamberlain et al. 2007).

Die hier untersuchten Stammzellen ließen sich erfolgreich isolieren und im Kultivierungsmedium vermehren. Die gelungene Isolation von caninen Stammzellen aus dem Fettgewebe wurde bereits in früher veröffentlichten Arbeiten berichtet (Neupane et al. 2008; Vieira et al. 2010; Guercio et al. 2012; Kang et al. 2012). Auch die Morphologie der isolierten Zellen entsprach der in der Literatur beschriebenen Morphologie von cASCs (Csaki et al. 2007; Neupane et al. 2008; Vieira et al. 2010). Des Weiteren zeigten die cASCs die Expression der Oberflächenmarker CD90 und CD105, die ebenfalls in den bekannten Publikationen beschrieben wurde (Dominici et al. 2006; Neupane et al. 2008). Die Differenzierungskapazität der cASCs in Knochen-, Knorpel- und Fettgewebe gelang ebenso, wenn auch erst nach einigen Veränderungen der Versuchsprotokolle. All diese Eigenschaften zeigen die Multipotenz und die Plastizität der cASCs, wie sie auch in anderen Spezies vorkommen (Zuk et al. 2002; Kamishina et al. 2006; Liu et al. 2007).

Die Isolierung und Kultivierung der MSCs aus dem Fettgewebe von Hunden wurde auf der Grundlage einer etablierten Methode (Arnhold et al. 2007; Arnhold und Wenisch 2015) durchgeführt. Die aus dem Fettgewebe der Hunde isolierten Zellen konnten aufgrund ihrer Eigenschaften wie Plastik-Adhärenz, Expression spezifischer Oberflächenmarker und ihrer Differenzierungskapazität in die adipogene, chondrogene, osteogene und neuronale Linie als mesenchymale Stammzellen definiert werden.

Um alle Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit miteinander vergleichen zu können, wurden die Zellen der verschiedenen Hunde unter gleichen Bedingungen kultiviert, differenziert und die Untersuchungen einheitlich mit Zellen der dritten Passage durchgeführt.

#### 5.2.1.1 Die osteogene Differenzierung

Bei der histologischen Untersuchung der osteogenen Differenzierung fiel auf, dass die caninen ASCs unter Verwendung des allgemeinen Differenzierungsprotokolls zunächst keine Mineralisierung zeigten und somit kein Calcium-Nachweis gelang. Dies könnte daran liegen, dass es sich bei dem Differenzierungsprotokoll um ein Protokoll handelt, welches auch zur osteogenen Differenzierung anderer Spezies dient (Pittenger et al. 1999; Arnhold et al. 2007). Dass canine MSCs unter modifizierten Protokollen jedoch besser osteogen differenzieren, konnten Volk et al. zeigen. Sie wiesen nach, dass der Einsatz von Dexamethason, welches bei der osteogenen Differenzierung von humanen BMSCs und BMSCs der Ratte eingesetzt wird, bei caninen BMSC eher einen hemmenden Einfluss auf die osteogene Differenzierung hat (Volk et al. 2005). Sie untersuchten verschiedene Zusätze und Medien und konnten zeigen, dass der Einsatz von BMP-2 (bone morphogenetic protein 2) und Ascorbinsäure zu einer erfolgreichen Differenzierung der Hundezellen führt. Allerdings konnten sie auch große inter-individuelle Unterschiede während der Differenzierung feststellen (Volk et al. 2005). So war der osteoinduktive Effekt von Ascorbinsäure beim Hund beispielsweise altersabhängig. Demnach könnten die nicht ganz eindeutigen Ergebnisse der Differenzierung an der Verwendung von Dexamethason und vor allem an den individuellen Unterschieden der Hunde liegen. Um dies zu testen, wurde das osteogene Differenzierungspotenzial der cASCs erneut untersucht. Hierfür wurde ein Versuchsprotokoll, basierend auf der Arbeit von Reich (Reich, Dissertation 2010) verwendet, bei dem unterschiedliche Calciumkonzentrationen zum Einsatz kamen.

Der Einsatz von Calcium sollte die Induktion der osteogenen Differenzierung fördern, da erhöhte Calciumkonzentrationen der Differenzierung und Proliferation von Osteoblasten sowie der Matrixmineralisierung dienen (Sharan et al. 2008; Theman und Collins 2009). Tryankowski et al. konnten zeigen, dass der Zusatz verschiedener Calciumkonzentrationen einen positiven Einfluss auf die Matrixmineralisierung von equinen MSCs hat (Tryankowski et al. 2010).

In der vorliegenden Arbeit zeigte schließlich die Mehrheit der Zellen bereits nach 7 Tagen die Tendenz, sich zu Zellknoten zusammenzuziehen. Diese Beobachtung machten auch Reich et al., die diese Wachstumsform der Zellen dazu nutzten, um die osteogene Differenzierung in einer dreidimensionalen Pelletkultur durchzuführen (Reich et al. 2012).

Der Zusatz von  $\text{CaCl}_2$  führte zu einer verbesserten osteogenen Differenzierung der cASCs. Allerdings verhielten sich nicht alle Proben und auch nicht alle Zellen innerhalb einer Probe gleich. Eine Mineralisierung konnte nicht in allen Zellpellets beobachtet werden. Reich et al. zeigten in ihrer Arbeit zur Charakterisierung von Stammzellen aus dem Fettgewebe und dem Knochenmark des Hundes, dass cASCs generell schlechter osteogen differenzieren und eine geringere Matrixmineralisierung zeigen als cBMSCs (Reich et al. 2012).

Für das eher geringe osteogene Differenzierungspotenzial der caninen ASCs würde eine Prädeterminierung in eine adipogene Richtung sprechen. Neupane et al. konnten bei ihrer Untersuchung zur osteogenen Differenzierung von cASCs feststellen, dass sich in Zellen, die sich zu Zellknötchen gebildet hatten, eine kalzifizierte Extrazellulärmatrix nachweisen ließ. Zellen im Monolayer allerdings zeigten keine solche Veränderung der Matrixstruktur (Neupane et al. 2008).

#### 5.2.1.2 Die adipogene Differenzierung

Bei dem ursprünglichen Protokoll für die adipogene Differenzierung handelt es sich um ein allgemeines Protokoll, welches auch der adipogenen Differenzierung von Zellen anderer Spezies dient. In Vorversuchen zur Differenzierung der cASCs konnte anhand dieses Protokolls keine erfolgreiche Differenzierung anhand einer positiven Oil Red O-Färbung festgestellt werden. Neupane et al. verwendeten daraufhin ein Protokoll, welches für die adipogene Differenzierung von humanen MSCs etabliert wurde. Das adipogene Differenzierungspotenzial der cASCs schien mit diesem Protokoll sehr limitiert (Neupane et al. 2008). Durch Modifikationen des Protokolls und des Einsatzes von *rabbit serum* und Rosiglitazon konnten die Zellen in der vorliegenden Arbeit in eine adipogene Linie differenziert und anhand der Oil Red O-Färbung Fettvakuolen sichtbar gemacht werden. Das hier verwendete Protokoll lehnt sich an das verbesserte Protokoll von Neupane et al. an.

Die Tatsache, dass nicht alle Zellen, sondern nur ein Teil der Zellen in der Positivkontrolle Fettvakuolen aufweisen, könnte darin begründet sein, dass nicht alle Zellen zeitgleich differenzieren, sondern unterschiedlich schnell auf bzw. mit den Differenzierungszusätzen reagieren.

### 5.2.1.3 Die chondrogene Differenzierung

Die Erforschung zum Einsatz von MSCs als Therapiemöglichkeiten verschiedener Erkrankungen bei Mensch und Tier erlangt immer größere Bedeutung. So zeigen Studien, dass die Injektion von frisch isolierten MSCs aus dem Fettgewebe in die Gelenke von Hunden mit Osteoarthritis vielversprechende Ergebnisse zeigen (Black et al. 2007). Fraglich ist hierbei jedoch, ob die positive Wirkung dieser Zellinjektion für eine Integration der Zellen in den Knorpel spricht oder ob es sich lediglich um die entzündungshemmende Wirkung der Zytokine der MSCs handelte (Caplan und Dennis 2006). Erfolgreiche Integrationen von MSCs in den Knorpel konnten hingegen in den Studien von Lee et al. und Mokbel et al. (Lee et al. 2007; Mokbel et al. 2011) nachgewiesen werden. Somit ließ sich die Fähigkeit zur chondrogenen Differenzierung der MSC *in vivo* belegen.

Ebenfalls konnte die *in vitro* Differenzierung von MSCs in Knorpelgewebe durch verschiedene Studien gezeigt werden. Für die chondrogene Differenzierung der MSCs wurden die Zellen von vielen Autoren in Low Glucose DMEM Medium unter Serumentzug kultiviert. Weitere Bestandteile des Differenzierungsmediums waren die Zusätze Dexamethason und Isoformen von TGFβ. Die chondrogene Differenzierung wurde dabei in Pelletform sowie in Hochdichte-Kulturen im Monolayer beschrieben (Pittenger et al. 1999; Lin et al. 2005; Liu et al. 2007). Für histologische Färbungen und die elektronenmikroskopische Untersuchungen eignete sich bevorzugt die Pelletform. Diese dreidimensionale Kulturform beeinflusst die Zellen positiv, da sie durch den engen Kontakt mit der extrazellulären Matrix zur Differenzierung angeregt werden (Erickson et al. 2002).

In der vorliegenden Arbeit ist in chondrogen differenzierten wie auch in undifferenzierten Pellets eine positive Alzianblau-Färbung mit einer Präsenz von Proteoglykanen zu erkennen. Eben dieses Ergebnis stellten auch Neupane et al. bei der Charakterisierung von cASCs fest (Neupane et al. 2008).

### 5.2.2 Die Morphologie neuronal differenzierter cASCs

Canine Stammzellen aus dem Fettgewebe zeigen in natürlichem, undifferenziertem Zustand eine flache, Fibroblasten-ähnliche Gestalt. Auch Vieira et al. und Neupane et al. beschrieben die Gestalt der cASCs als Fibroblasten-ähnlich (Neupane et al. 2008; Vieira et al. 2010).

Die Ergebnisse zur Analyse der Morphologie neuronal differenzierter Zellen durch Zugabe des neuronalen Differenzierungsmediums zeigen eine morphologische Veränderung der cASCs in Richtung einer Neuronen-ähnlichen Gestalt. Es lassen sich runde Zellkörper mit zusammengezogenem Zytoplasma und mehreren Zellausläufern erkennen. Diese



Umwandlung in eine Nervenzell-ähnliche Morphologie wurde auch bei caninen Zellen aus dem Knochenmark beschrieben. So konnten Edamura et al. ein rundliches Soma und lange Zellausläufer bei der neuronalen Differenzierung von cBMSCs beobachten (Edamura et al. 2012). Die morphologischen Veränderungen wurden in der vorliegenden Arbeit bereits nach einer Stunde neuronaler Induktion festgestellt. Diese morphologische Umwandlung konnte ebenfalls in Studien mit cBMSCs und caninen Amnionzellen erkannt werden (Edamura et al. 2012; Oda et al. 2013). Nach 7 Tagen Differenzierung ließen sich Synapsen-ähnliche Kontaktzonen zwischen einzelnen Zellen erkennen. Diese Beobachtung ist identisch mit der Beschreibung von Edamura et al., die eine Formation eines Synapsen-ähnlichen Netzwerkes bei neuronal differenzierten cBMSCs entdeckten (Edamura et al. 2012).

### 5.2.3 Molekularbiologische Ergebnisse

Um das neuronale Differenzierungspotenzial der cASCs zu analysieren, wurden die Zellen nach 3h, 24h und 72h morphologisch, immunhistochemisch sowie molekularbiologisch untersucht. In Vorversuchen wurde die Dauer der Differenzierung auf bis zu 10 Tage ausgeweitet. Hierbei ließ sich allerdings feststellen, dass viele Zellen bereits nach 3 bis 4 Tagen im neuronalen Differenzierungsmedium verstarben. Somit wurde entschieden, die Zellen für 72 Stunden in neuronalem Medium zu inkubieren. Da, wie auch in der Literatur erwähnt, eine sichtbare morphologische Veränderung der Zellen bereits nach kurzer Zeit eintrat, wurde der früheste Untersuchungszeitpunkt auf 3 Stunden festgelegt (Safford et al. 2002).

Für die Untersuchung wurden Differenzierungsmarker verwendet, die während der Neurogenese und der Differenzierung von Nervenzellen von Bedeutung sind. Hierzu zählen der gliale Marker GFAP sowie die neuronalen Marker MAP2 und  $\beta$ -III-Tubulin. Da relativ frühe Zeitpunkte der neuronalen Differenzierung untersucht wurden, wurde auch die Expression von Nestin, einem Marker in glialen und neuronalen Vorläuferzellen, untersucht. Ebenso erfolgte eine Analyse der Neurotrophine NGF, BDNF und GDNF, die beim Wachstum und dem Überleben der Nervenzellen eine Rolle spielen.

Im Folgenden werden die Expressionsmuster resultierend aus der qRT-PCR sowie die Ergebnisse des Western Blots für jeden Marker einzeln diskutiert.

Nestin ist ein Intermediärfilamentprotein, welches in neuralen Vorläuferzellen exprimiert wird (Lendahl et al. 1990). Während der Embryogenese zeigt sich eine Nestin-Expression in migrierenden und proliferierenden neuralen Vorläuferzellen, im Laufe der neuronalen

Reifung der Zellen sinkt die Expression wieder (Lendahl et al. 1990). Im adulten Gewebe spielt Nestin vor allem bei der Regeneration eine Rolle (Wiese et al. 2004).

Bei der Untersuchung der Nestin-Expression fällt zunächst auf, dass Nestin bereits in den undifferenzierten cASCs exprimiert wird. Auch die neuronal differenzierten cASCs zeigen eine Nestin-Expression, die allerdings nach 3h Differenzierung am stärksten ist und im weiteren Differenzierungsverlauf abnimmt. Diese Beobachtung erklärt sich mit der Funktion von Nestin als Marker für neurale Vorläuferzellen. Auch Woodbury et al. konnten in Versuchen zur neuronalen Differenzierung von Stammzellen aus dem Knochenmark der Ratte zeigen, dass die Nestin-Expression nach 5h am höchsten war und anschließend im weiteren Verlauf abnahm. Nach 6 Tagen neuronaler Differenzierung ließ sich keine detektierbare Menge an Nestin-mRNA mehr feststellen (Woodbury et al. 2000). Long et al. untersuchten die neuronale Differenzierung von humanen Stammzellen aus dem Knochenmark mittels qRT-PCR und zeigten, dass auch undifferenzierte Zellen Nestin exprimieren. Allerdings stieg die Nestin-Expression in differenzierten Zellen an (Long et al. 2005). Im Gegensatz zu dieser Studie sank die Expression von Nestin in der vorliegenden Arbeit nach neuronaler Induktion signifikant ab. In Western Blot-Analysen zur neuronalen Differenzierung von murinen Stammzellen aus dem Fettgewebe fanden Safford et al. heraus, dass die differenzierten Zellen positiv für eine Nestin-Expression sind. Allerdings konnte im Western Blot keine Expression von Nestin in undifferenzierten Zellen nachgewiesen werden, in der Immunhistochemie hingegen zeigte sich eine schwache Nestin-Expression in undifferenzierten Zellen (Safford et al. 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte Nestin aufgrund seiner Proteingröße nicht im Western Blot nachgewiesen werden.

Das Mikrotubuli-assoziierte-Protein 2 wird in neuralen Vorläuferzellen exprimiert, wobei dessen Expression zu Beginn eher schwach ist, im weiteren Verlauf der Reifung der Zellen nimmt die Expression von MAP2 jedoch zu. Da MAP2 eine wichtige Rolle für die Stabilität des Zytoskeletts der Zelle spielt (Shiomura und Hirokawa 1987; Hirokawa et al. 1988) und auch von großer Bedeutung für die Neuritenformation und das Neuritenwachstum (Dinsmore und Solomon 1991) und somit für die Dendriten und das Axon der Neurone ist, wurde hier angenommen, dass eine Expression von MAP2 durch die neuronale Differenzierung in den untersuchten cASCs nachzuweisen ist.

Bei der Analyse der qRT-PCR-Ergebnisse lässt sich feststellen, dass die Expression von MAP2 im Differenzierungsverlauf im Zeitraum von 3h bis 72h signifikant ansteigt. Dies lässt sich mit der oben beschriebenen Aussage nachvollziehen. Auch Yaghoobi und Mowla konnten in neuronal differenzierten BMSCs der Ratte mittels qRT-PCR eine Expression von MAP2 registrieren, die zu Beginn der Differenzierung kaum, nach 6 bis 48 Stunden neuronaler Induktion jedoch deutlich nachweisbar war (Yaghoobi und Mowla 2006). Auch

dieses Ergebnis ähnelt dem der vorliegenden Arbeit und lässt sich mit der Funktion von MAP2 als später neuronaler Marker erklären.

Bei  $\beta$ -III-Tubulin handelt es sich um ein Protein aus der Familie der Tubuline, welches vor allem bei dem Axonenwachstum und der Gehirnentwicklung eine Rolle spielt (Katsetos et al. 2003). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass  $\beta$ -III-Tubulin bereits in undifferenzierten cASCs exprimiert wird. Diese Expression steigt durch die neuronale Induktion signifikant an. Im weiteren Verlauf der Differenzierung sinkt die  $\beta$ -III-Expression allerdings wieder. In der vorliegenden Arbeit konnte im Western Blot  $\beta$ -III-Tubulin in differenzierten und in undifferenzierten Zellen nachgewiesen werden. Hierbei fiel auf, dass die Banden der undifferenzierten Zellen deutlicher sichtbar waren als die Banden der neuronal differenzierten Zellen. Das Ergebnis des Western Blots stimmt somit mit dem Ergebnis der qRT-PCR überein, das zeigt, dass die  $\beta$ -III-Expression in undifferenzierten cASCs höher ist als in den differenzierten Zellen. Eine Erklärung für die sinkende  $\beta$ -III-Tubulin-Expression während des Differenzierungsverlaufs bietet die Tatsache, dass es sich hierbei um einen frühen neuronalen Marker handelt (Fanarraga et al. 1999).

Eine positive Genexpression von GFAP, einem Intermediärfilament glialer Zellen, konnte in der vorliegenden Arbeit mittels qRT-PCR weder in differenzierten noch in undifferenzierten cASCs gezeigt werden. Auch Bamji et al. und Uranio et al. gelang bei ihrer Untersuchung zum Differenzierungspotenzial von caninen Zellen aus Amnionflüssigkeit, der Amnionmembran und der Nabelschnurmatrix mithilfe der qRT-PCR kein Nachweis einer GFAP-Expression in differenzierten und undifferenzierten Zellen (Bamji et al. 1998; Filioli Uranio et al. 2011). Bezüglich der fehlenden GFAP-Expression nahmen wir zunächst an, dass der GFAP-Primer nicht spezifisch genug sein könnte. Da er aber bei der qRT-PCR-Untersuchung eine erkennbare GFAP-Expression im caninen Hirngewebe zeigte, muss diskutiert werden, warum GFAP in den von uns untersuchten cASCs, differenziert und undifferenziert, nicht exprimiert wurde. Bei GFAP handelt es sich um ein Intermediärfilament, welches in reifen Astrozyten exprimiert wird, es stellt demnach einen glialen Marker dar (Eng et al. 2000). Wir vermuteten zunächst, dass sich in der kurzen Differenzierungszeit von 72h noch keine reifen Astrozyten herausgebildet haben. Allerdings konnte GFAP positiv im Western Blot nachgewiesen werden. Somit stellt sich die Frage, ob GFAP mittels qRT-PCR überhaupt in neuronal differenzierten cASCs nachgewiesen werden kann.

Die Ergebnisse des Western Blots der vorliegenden Arbeit zeigen, wie bereits erwähnt, einen positiven Proteinnachweis für GFAP in differenzierten und undifferenzierten Zellen. Große Unterschiede in der Proteinmenge lassen sich zwischen den Zellen hierbei nicht feststellen. Warum sich GFAP nicht in der qRT-PCR, aber mittels Immunhistochemie und Western Blot

nachweisen lässt, kann nur vermutet werden. Möglicherweise existieren Isoformen von GFAP in caninen Fettgewebstammzellen, die nicht durch die Primer, wohl aber durch die Antikörper erkannt werden können. Verschiedene Isoformen von GFAP im zentralen Nervensystem sind beispielsweise bei der Maus bekannt (Kamphuis et al. 2012).

In weiterführenden Studien könnte die Expression des glialen Markers Vimentin untersucht werden. Bei Vimentin handelt es sich um einen Marker, der in unreifen Astrozyten exprimiert wird (Mamber et al. 2012). So könnte eventuell gezeigt werden, ob canine ASCs oder canine Stammzellen aus anderem Gewebe gliale Marker exprimieren. Da es sich bei GFAP um einen späten Marker handelt, der erst in vollständig ausgebildeten und funktionsfähigen Gliazellen exprimiert wird, könnte es sein, dass nach 3-72 Stunden neuronaler Inkubation der cASCs zwar eine Vimentin-, aber noch keine GFAP-Expression nachzuweisen ist.

NGF, BDNF und GDNF sind Neurotrophine, die das Wachstum, die Differenzierung, die Proliferation und die Erhaltung von Nervenzellen gewährleisten. In Betrachtung der qRT-PCR-Ergebnisse fällt auf, dass alle Neurotrophine in differenzierten wie auch in undifferenzierten cASCs exprimiert werden. Woodbury et al. fanden heraus, dass der Rezeptor für den *nerve growth factor*, TrkA, bereits nach 5 Stunden neuronaler Differenzierung in Knochenmarkszellen der Ratte detektierbar war (Woodbury et al. 2000).

Weiterhin ist bekannt, dass Neurotrophine nicht nur in neuronal differenzierten Zellen, sondern auch in undifferenzierten MSCs exprimiert werden (Chen et al. 2002; Nicaise et al. 2011; Brohlin et al. 2012). Zhang et al. konnten NGF und BDNF in ihrer Studie zum Vergleich des neuronalen Differenzierungspotenzials humaner BMSCs und ASCs in undifferenzierten Zellen nachweisen (Zhang et al. 2012). Die Genexpression beider Neurotrophine stieg im Laufe der neuronalen Differenzierung an (Zhang et al. 2012). Bei Betrachtung der Neurotrophinexpression der vorliegenden Arbeit fällt auf, dass die NGF-Expression 3h nach Differenzierungsbeginn am höchsten ist und anschließend signifikant absinkt. Weiterhin gibt es keinen signifikanten Unterschied in der relativen Expression zwischen undifferenzierten und differenzierten Zellen. Diese Beobachtung ähnelt der von Yaghoobi und Mahani, die BMSCs der Ratte neuronal differenzierten (Yaghoobi und Mahani 2008). Zwei Stunden nach neuronaler Induktion zeigen die BMSCs die höchste Expression an NGF, die im weiteren Verlauf absank. Die Untersuchung von BDNF ergab eine weitestgehend konstante Expression im Differenzierungsverlauf. Auch in der vorliegenden Arbeit konnten keine signifikanten Unterschiede der BDNF-Expression im Differenzierungsverlauf ermittelt werden. Die Abnahme der NGF-Expression bei einer zeitgleichen Steigerung der Expressionen von BDNF und GDNF während der hier untersuchten neuronalen Differenzierung könnte bedeuten, dass NGF in einem sehr frühen Stadium stärker in der Differenzierung involviert ist als die anderen Neurotrophine.

#### 5.2.4 Immunhistochemische Untersuchung

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Analyse zeigen, dass alle untersuchten glialen und neuronalen Marker in differenzierten cASCs, aber auch in undifferenzierten Zellen nachgewiesen werden können. Diese Resultate decken sich mit den Ergebnissen der qRT-PCR-Auswertung. Allerdings gelang in der PCR kein detektierbarer Nachweis an GFAP-mRNA. Die immunhistochemische Untersuchung zeigt jedoch, dass GFAP sowohl in den differenzierten als auch in den undifferenzierten cASCs exprimiert wird.

Kamishina et al. zeigten bei ihrer Untersuchung zur neuronalen Differenzierung von caninen Knochenmarkszellen, dass GFAP sowie  $\beta$ -III-Tubulin in undifferenzierten und differenzierten Zellen exprimiert werden (Kamishina et al. 2006). Ein ähnliches Resultat ergab die Studie von Kim et al., die ebenfalls GFAP und  $\beta$ -III-Tubulin positiv in undifferenzierten und neuronal differenzierten caninen Amnionzellen nachwiesen (Kim et al. 2014). In einer immunhistologischen Studie zur neuronalen Differenzierung von caninen BMSCs konnten Oda et al. zeigen, dass ein Großteil der differenzierten Zellen positiv für GFAP, MAP2, Nestin und  $\beta$ -III-Tubulin war (Oda et al. 2013). Allerdings wurde nicht beschrieben, ob diese Expressionen auch in undifferenzierten Zellen festgestellt werden konnten.

Safford et al. untersuchten die neuronale Differenzierung von murinen Stammzellen aus dem Fettgewebe und stellten mittels Immunhistochemie eine positive GFAP-Expression von neuronal differenzierten Zellen fest (Safford et al. 2004). Im Gegensatz dazu fand sich keine Expression von GFAP in undifferenzierten Zellen (Safford et al. 2004). Keine GFAP-Expression, weder mittels immunhistochemischer Untersuchung noch anhand einer Western Blot-Analyse, konnten Wenisch et al. in neuronal differenzierten Knochenzellen nachweisen (Wenisch et al. 2006).

Weiterhin lässt sich anhand der immunhistologischen Untersuchung erkennen, dass undifferenzierte und differenzierte cASCs sowie canines Hirngewebe positiv für A2B5 sind. Hierbei handelt es sich um einen Marker für gliale Vorläuferzellen, der an Ganglioside im embryonalen und neonatalen sowie adulten Gewebe bindet (Dietrich et al. 2002).

Bei den Expressionsmustern der einzelnen Marker in der vorliegenden Arbeit fällt auf, dass sich die Expression vor allem auf das Zytoplasma der Zellen konzentriert. Dies geht einher mit der Tatsache, dass es sich bei  $\beta$ -III-Tubulin und MAP2 um Proteine handelt, welche für die Stabilisierung der Mikrotubuli verantwortlich sind. Auch Nestin und GFAP als Intermediärfilamente spielen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des Zytoskeletts der Zellen. Die erhöhte Expression dieser Marker in neural differenzierten Zellen lässt sich damit erklären, dass Neurone und Gliazellen verschiedene Ausläufer besitzen, unter anderem Dendriten und Axone, die durch diese Proteine geformt und stabilisiert werden.

### 5.2.5 Neuronale Marker in undifferenzierten Zellen

Bei der vorliegenden Analyse zur Markerexpression fällt auf, dass neben GFAP, welches in den cASCs nicht nachweisbar war, alle weiteren untersuchten Marker auch in undifferenzierten Zellen exprimiert werden. Die Expression neuraler Marker in undifferenzierten Zellen wird der multidifferentiellen Fähigkeit der Stammzellen zugeschrieben, mesodermale, ektodermale und endodermale Gene der Keimbahn zu exprimieren (Woodbury et al. 2002). Eine spontane Expression neuronaler und glialer Marker lässt sich daher mit der Veranlagung von Stammzellen erklären, in neuronale Linien zu differenzieren (Foudah et al. 2013).

Foudah et al. untersuchten die Expression neuronaler und glialer Marker in undifferenzierten Zellen aus Geweben unterschiedlicher Abstammung, unter anderem aus humanem Fettgewebe. Hierbei konnte gezeigt werden, dass undifferenzierte hASCs in niedrigen Passagen Nestin exprimieren, Zellen höherer Passagen aber nicht mehr positiv für Nestin waren (Foudah et al. 2014). Dies lässt sich damit erklären, dass Nestin in neuronalen Vorläuferzellen exprimiert und anschließend durch späte Marker wie MAP2 oder GFAP ersetzt wird. Nestin wird auch in humanen Knochenmarkszellen (Sanchez-Ramos et al. 2000; Vogel et al. 2003; Long et al. 2005) sowie in murinen Knochenmarkszellen exprimiert (Sanchez-Ramos et al. 2000).

Bei Foudah et al. fiel auf, dass undifferenzierte hASCs frühe und späte neuronale und gliale Marker exprimierten. So zeigten 90% der Zellen eine Expression für den frühen neuronalen Marker  $\beta$ -III-Tubulin und 80% waren positiv für den späten neuronalen Marker NeuN. Foudah et al. erklären die hohe  $\beta$ -III-Tubulin-Expression in undifferenzierten Zellen mit der Tatsache, dass  $\beta$ -III-Tubulin ein intrinsischer Faktor und wahrscheinlich im Prozess des Zellwachstums involviert ist (Foudah et al. 2014).

Auch in undifferenzierten caninen BMSCs fanden Kamishina et al. eine deutliche  $\beta$ -III-Tubulin-Expression, die keinen signifikanten Unterschied zu neuronal differenzierten Zellen aufwies (Kamishina et al. 2006). Ebenfalls ließ sich eine spontane  $\beta$ -III-Tubulin-Expression in humanen und felines Knochenmarkszellen (Deng et al. 2001; Martin et al. 2002; Kim et al. 2002) und in undifferenzierten caninen Zellen aus Amnionflüssigkeit (Kim et al. 2014) finden. Der gliale Marker GFAP konnte bei Foudah et al. in Zellen der Passage drei nicht nachgewiesen werden, allerdings zeigte sich eine geringe GFAP-Expression in undifferenzierten hASCs der Passage sechs, während 70% der Zellen in Passage 16 positiv für GFAP waren (Foudah et al. 2014). Die GFAP-Expression in höheren Passagen könnte auch eine Erklärung dafür sein, dass in der vorliegenden Arbeit keine GFAP-positiven Zellen festgestellt werden konnten, da ausschließlich mit Zellen der dritten Passage gearbeitet wurde. Sanchez-Ramos et al. zeigten allerdings mittels Immunhistochemie eine GFAP-

Expression in Zellen der Passagen vier bis fünf vor und nach einer neuronalen Differenzierung (Sanchez-Ramos et al. 2000). Jin et al. konnten hingegen nur wenige neuronal differenzierte Zellen mit einer positiven Immunreaktivität nachweisen (Jin et al. 2003).

Der neuronale Marker MAP2 konnte ebenfalls positiv in undifferenzierten humanen Knochenmarkszellen nachgewiesen werden (Long et al. 2005).

Kim et al. zeigten, dass Zellen aus caniner Amnionflüssigkeit auch ohne neuronale Differenzierung Expressionen von Nestin,  $\beta$ -III-Tubulin und GFAP aufweisen. Allerdings war die Expression dieser Gene in neuronal differenzierten Zellen signifikant höher als in den undifferenzierten Zellen (Kim et al. 2014).

Bezüglich all dieser divergenter Ergebnisse wurde die Überlegung in Betracht gezogen, dass es sich bei mesenchymalen Stammzellen um eine heterogene Population von Stammzellen mit unterschiedlichen morphologischen und biochemischen Eigenschaften handelt (Sanchez-Ramos 2002). Darüber hinaus ist anzumerken, dass es keine einheitlichen, festgelegten Protokolle zur Isolation und Kultivierung der Stammzellen und zur Bestimmung des Ausmaßes ihrer Heterogenität gibt (Neuhuber et al. 2004).

#### 5.2.6 Expression neuraler Marker im Hundegehirn

Alle untersuchten Marker konnten mittels qRT-PCR in caninen Hirngewebe nachgewiesen werden. Ebenso gelang eine positive Dokumentation von GFAP, MAP2, Nestin, A2B5 und  $\beta$ -III-Tubulin anhand immunhistologischer Untersuchungen. Die Ergebnisse des Western Blots zeigen zudem, dass nicht nur die mRNA von GFAP und  $\beta$ -III-Tubulin im Hirngewebe vorliegt, sondern dass sich diese Marker auch auf Proteinebene nachweisen lassen. Auch Kim et al. fanden eine positive Expression von GFAP und  $\beta$ -III-Tubulin in caninem Hirngewebe (Kim et al. 2014). Zudem zeigte sich hinsichtlich der Menge an detektierbarer mRNA ein deutlicher Unterschied für beide Marker zwischen Hirngewebe und neuronal differenzierten Zellen zugunsten der Gewebeproben (Kim et al. 2014). Diese Beobachtung deckt sich mit den hier erhaltenen Resultaten des Western Blots.

Anhand der Ergebnisse der qRT-PCR kann vermutet werden, dass sich mehr reife als unreife Neurone in der untersuchten Probe befinden, da der späte neuronale Marker MAP2 stärker exprimiert wird als der frühe Marker  $\beta$ -III-Tubulin. Ebenfalls weist das Gewebe aufgrund der GFAP-Expression reife Gliazellen auf. Die hohe Expression von Nestin deutet auf neurale Vorläuferzellen im Hirngewebe hin.

### 5.3 Neuronale Differenzierung oder Artefakt?

Die Differenzierung von Stammzellen in eine neuronale Linie erfordert ein hohes Differenzierungspotenzial und wird durch eine Reihe von spezifischen, präzisen genetischen Vorgängen reguliert. Wie bereits erwähnt, beschreiben viele Autoren die Fähigkeit von Stammzellen aus verschiedenen Geweben und von unterschiedlichen Spezies, sich in neuronale und gliale Zellen zu differenzieren. Hierbei lässt sich die Frage stellen, wie festgestellt werden kann, ob sich eine Stammzelle wirklich in eine funktionsfähige Nervenzelle differenziert. Welche Kriterien sprechen demnach für eine erfolgreiche Differenzierung in Nervenzellen? Reh et al. legten einige Kriterien fest, um neuronale Zellen als eben solche zu definieren (Reh et al. 2002). Diese Zellen sollten (A) postmitotisch sein, (B) eine Zellpolarität durch ein einzelnes Axon und mehrere Dendriten aufweisen und (C) die Fähigkeit besitzen, Aktionspotenziale auszulösen und weiterzuleiten. Darüber hinaus sollten Neurone (D) über Synapsen mittels Neurotransmitter und deren Rezeptoren miteinander kommunizieren können (Reh et al. 2002).

Viele Publikationen belegen durch neuronale Induktion die morphologische Veränderung von Stammzellen in einen „Neuronen-ähnlichen“ Phänotyp (Woodbury et al. 2000; Safford et al. 2002; Kamishina et al. 2006; Wenisch et al. 2006; Oda et al. 2013; Kim et al. 2014). Auch in der vorliegenden Arbeit konnten solche Veränderungen durch Inkubation mit neuronalem Differenzierungsmedium festgestellt werden.

Wie lässt sich aber die morphologische Veränderung der Zellen zu dem genannten „Neuronen-ähnlichen“ Phänotyp erklären?

Lu et al. untersuchten diese Fragestellung anhand von Zellen verschiedener Abstammung. Alle Zellen wurden mit  $\beta$ -Mercaptoethanol oder DMSO/BHA neuronal differenziert. In jedem Versuch konnte eine morphologische Veränderung der Zellen festgestellt werden (Lu et al. 2004). Allerdings wurde in der Zeitraffer-Mikroskopie beobachtet, dass diese Veränderung nicht in einem Neuritenwachstum resultierte, sondern dass die Zellen eher schrumpften und sich das Zytoplasma sowie Zellausläufer zum Soma hin zurückzog (Lu et al. 2004). Lediglich einige Neuriten-ähnliche Fortsätze blieben bestehen. Daraufhin wurde untersucht, ob diese morphologische Differenzierung Ergebnis des neuronalen Inkubationsmediums war oder ob die Veränderung der Zellform auf Zytotoxizität basierte. Die Zellen wurden mehreren Stressoren, unter anderem den Detergenzien Tween 20 und Triton X-100, einer supraphysiologischen Konzentration Natriumchlorid und extremen pH-Werten, ausgesetzt. In allen Fällen fiel auf, dass die Reaktion der Zellen durch Inkubation mit den verschiedenen Stressoren in der gleichen Weise resultierten wie während einer Inkubation mit neuronalem



Differenzierungsmedium (Lu et al. 2004). Alle Zellen zeigten eine „pseudoneuronale“ Morphologie. Um anschließend zu überprüfen, ob die Zellen immunreaktiv für die Expression neuronaler Marker waren, wurden die Zellen auf solche Expressionen hin mittels Immunfärbung untersucht. Undifferenzierte Zellen zeigten eine schwache Färbung des neuronalen Markers NSE, nach der Differenzierung zeigte sich diese Färbung deutlich dunkler. Allerdings reagierten Zellen, die mit Tween 20 und Triton X-100 behandelt wurden, in derselben Weise wie die neuronal differenzierten Zellen. Außerdem konnten Lu et al. feststellen, dass eine Behandlung mit hoch-molarem NaCl in einer noch dunkleren Färbung von NSE resultierte (Lu et al. 2004). Besonders fragwürdig im Hinblick auf das neuronale Differenzierungspotenzial der Zellen war, dass eine NSE-Immunfärbung in Nervenzellen hauptsächlich im Zytoplasma dominierte, während die mit DMSO/BHA differenzierten Zellen diese Färbung vor allem im Nucleus zeigten (Schmechel et al. 1980). Auch die immunhistochemische Färbung der Zellen mit NeuN, einem weiteren neuronalen Marker, zeigten ähnliche Ergebnisse. Bei der Immunfärbung mit Nestin zeigte ein Teil der undifferenzierten Zellen eine Färbung, der andere Teil nicht. Weder durch die Inkubation mit DMSO/BHA noch mit einem der Stressoren verstärkte sich diese Färbung. Weitere Immunfärbungen mit den Markern GFAP,  $\beta$ -III-Tubulin und MAP2 zeigten auch keine positiven Expressionen.

Bei der Analyse der qRT-PCR des Markers NSE konnten Lu et al. interessanterweise feststellen, dass dessen Expression ein ähnliches Muster vor und nach der neuronalen Differenzierung mit DMSO/BHA aufwies (Lu et al. 2004). Die dunklere Färbung und eine stärkere Expression von NSE während der immunhistochemischen Untersuchung konnte demnach auf molekularbiologischer Ebene nicht bestätigt werden. Somit konnten keine signifikanten Veränderungen und kein Anstieg dieses Markers durch die Differenzierung gezeigt werden.

Lu et al. bezeichneten die Reaktionen der Zellen und die morphologischen Veränderungen auf die Differenzierung und die verschiedenen Stressoren als „Stressantwort“ (Lu et al. 2004).

Da die Zellen lediglich 5 Stunden mit dem neuronalen Differenzierungsmedium inkubiert wurden und bereits nach dieser kurzen Zeit morphologische Veränderungen auftraten, kann es sich laut Lu et al. nicht um eine vollständige neuronale Differenzierung handeln, bei der reife, funktionsfähige Nervenzellen entstehen. Fünf Stunden seien viel zu kurz, um eine neue Genexpression zu regulieren und Neuronen-spezifische Gene zu translatieren (Lu et al. 2004). Auch Maltman et al. hegen Zweifel an einer solch schnellen Differenzierung von Zellen zu reifen Neuronen und Gliazellen (Maltman et al. 2011). Die neuronale Differenzierung ist ein hoch komplexer Vorgang, bei der *in vivo* eine große Menge an Genen reguliert werden müssen. Für Maltman et al. ist es daher fragwürdig, ob MSCs innerhalb

kurzer Zeit diesen molekularen Veränderungen zu reifen, funktionsfähigen Nervenzellen unterliegen können (Maltman et al. 2011).

Bei ihren Untersuchungen konnte Lu et al. weiterhin feststellen, dass nicht nur Stammzellen aus dem Knochenmark oder Fettgewebe wie oben beschrieben reagieren, sondern auch Zellen ohne stammzelltypische Eigenschaften wie Fibroblasten oder HEK 293-Zellen (Lu et al. 2004; Neuhuber et al. 2004). Dies könnte ein weiterer Beweis dafür sein, dass die neuronale Differenzierung von Stammzellen oftmals eher eine Stressantwort der Zellen als eine reale Differenzierung in die neuronale Richtung ist.

Des Weiteren deuten viele Studien darauf hin, dass eine neuronale Induktion sowie eine neuronale Differenzierung auch durch den Zellzyklus bestimmt werden, der die Erhaltung, die Proliferation, Spezifizierung und die Differenzierung der Zellen reguliert (Bally-Cuif und Hammerschmidt 2003; Cremisi et al. 2003). Die Studien von Lu et al. und Woodbury et al. zeigten, dass neuronal induzierte MSCs schrumpfen und eine „Neuronen-ähnliche“ Gestalt annehmen, ohne einer Zellteilung zu unterliegen (Woodbury et al. 2000; Lu et al. 2004). Diese Tatsache wird durch die Beobachtung von Munoz-Elias et al. unterstützt, die zeigen konnten, dass MSCs direkt zu Neuronen differenzieren können, ohne eine Mitose zu durchlaufen (Munoz-Elias et al. 2003).

In Studien zum elektrophysiologischen Potenzial der neuronal differenzierten Zellen fanden Hofstetter et al. heraus, dass die Neuronen-ähnlichen Zellen 48 Stunden nach neuronaler Induktion weder Aktionspotenziale noch spannungs-abhängige Natrium- oder Kaliumkanäle aufwiesen (Hofstetter et al. 2002). Es wurde deshalb diskutiert, ob sich diese Zellen im frühen Stadium der neuronalen Differenzierung noch in einem unreifen Zustand befinden. Allerdings zeigten diese Zellen eine positive Immunfärbung für das Neurofilament N in ihren Ausläufern, was auf reife Nervenzellen hindeutet (Woodbury et al. 2000). Zusätzlich fanden Jin et al. heraus, dass sich die Verteilung bzw. Verbreitung neuronaler Marker innerhalb neuronal differenzierter Zellen von der in normalen Nervenzellen unterscheidet (Jin et al. 2003). Dies deutet darauf hin, dass neuronal differenzierte Zellen nicht die funktionellen Eigenschaften von reifen Neuronen besitzen (Jin et al. 2003). Auch Wenisch et al. untersuchten die elektrophysiologische Kapazität neuronal differenzierter Zellen, hierbei konnten jedoch keine elektrischen Signale festgestellt werden (Wenisch et al. 2006). Damit einhergehend konnte gezeigt werden, dass nur eine sehr geringe Anzahl der neuronal differenzierten Knochenzellen das Synaptophysin, ein in Nervenzellen enthaltenes integrales Membranprotein, exprimieren (Wenisch et al. 2006). Die Menge an Synaptophysin steigt parallel mit der Ausbildung und Formation von Synapsen (Knaus et al. 1986).

Es findet sich allerdings auch eine Studie, die von einer positiven elektrophysiologischen Antwort der neuronal differenzierten Zellen berichtet (Wislet-Gendebien et al. 2005a). In Bezug auf Rehs et al. Kriterien für Neurone diskutierten Wislet-Gendebien et al. jedoch, dass es sich bei den von ihnen neuronal differenzierten Zellen zwar um Zellen handelt, die in der Lage sind, funktionelle Eigenschaften von Neuronen anzunehmen, bei diesen Zellen allerdings nicht von reifen Neuronen gesprochen werden darf. Zwar zeigten diese differenzierten Zellen elektrophysiologische Signale als Antwort auf die Applikation verschiedener Neurotransmitter, aber es fehlte der Beweis der erfolgreichen Kommunikation über Synapsen untereinander (Wislet-Gendebien et al. 2005b).

Mit Rücksicht auf die vorliegende Arbeit muss erwähnt werden, dass Butylhydroxianisol ein Zusatz des verwendeten neuronalen Differenzierungsmediums war. Aufgrund dessen und in Hinblick auf die Ergebnisse von Lu et al. kann demnach nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei der morphologischen Veränderung um eine Reaktion der Zellen auf das Differenzierungsmedium handelt. Die qRT-PCR-Ergebnisse zeigen jedoch, dass die untersuchten Marker MAP2, BDNF,  $\beta$ -III-Tubulin und Nestin eine signifikante Veränderung in ihrem Expressionsmuster durch die neuronale Induktion aufweisen. Lediglich NGF und GDNF weisen keine großen Unterschiede in ihrer prä- und post-Expression auf. Die immunhistochemische Untersuchung deckt sich im Gegensatz zu Lu's Studie allerdings mit den Resultaten der qRT-PCR. Bei Betrachtung des Hinweises, eine vollständige zelluläre Differenzierung vollziehe sich nicht innerhalb einiger Stunden (Maltman et al. 2011) muss jedoch weiterhin überprüft werden, ob es sich hierbei um eine aussagekräftige Differenzierung handelt.

All diese Ergebnisse deuten letztendlich darauf hin, dass eine umfassende Studie zur neuronalen Differenzierung nicht nur morphologische und immunzytochemische Untersuchungen beinhalten sollte, sondern vielmehr auch die Überprüfung dieser Differenzierung auf molekularbiologischer und elektrophysiologischer Ebene. Ansonsten sei es kritisch, von einer erfolgreichen neuronalen Differenzierung zu sprechen und man müsse davon ausgehen, dass die chemisch neuronale Induktion der MSCs keinen Differenzierungsprozess darstelle, sondern eine zelluläre Antwort auf Stress sei (Woodbury et al. 2000; Lu et al. 2004; Neuhuber et al. 2004).

## 5.4 Ausblick

Canine ASCs aus dem Fettgewebe stellen eine vielversprechende Quelle für die Therapie von Erkrankungen des zentralen Nervensystems dar. Sie sind leicht zugänglich und können in großer Anzahl gewonnen und erfolgreich kultiviert und vervielfacht werden. Die gegenwärtige Arbeit liefert einen Hinweis auf das neuronale Differenzierungspotenzial dieser Zellen, welches in weiteren Studien tiefgreifender untersucht werden sollte. Der Nachweis später neuronaler und glialer Marker mithilfe molekularbiologischer Methoden sowie die Untersuchung des elektrophysiologischen Potenzials der Zellen und ihre Fähigkeit, miteinander erfolgreich über Synapsen zu kommunizieren, sind Bestandteile zukünftiger Forschung auf diesem Gebiet. In weiteren Untersuchungen muss die Funktionalität der neuronal differenzierten cASCs und ihr therapeutisches Potenzial in neurologisch erkrankten Tieren demonstriert werden. Gelingt es, reife und voll funktionsfähige von Stammzellen abgeleitete Neurone und Gliazellen durch cASCs zu gewinnen, steht einem Einsatz im Tiermodell und einer späteren Transplantation in den Menschen zur Behandlung neurologischer Erkrankungen nichts im Wege.

In Zukunft sollte versucht werden, einheitliche und vorgeschriebene Protokolle zur Isolation und Kultivierung von Stammzellen zu kreieren, um von vornherein Unterschiede in der Grundhaltung der Stammzellen auszuschließen und um Ergebnisse wissenschaftlich besser vergleichen und evaluieren zu können. Des Weiteren sollten allgemeine Versuchsprotokolle zur neuronalen Differenzierung festgelegt werden, um eben genanntes ebenfalls auszuschließen und um einen besseren Überblick für die Genexpression neuronal differenzierter Zellen zu erhalten.

Zum jetzigen Zeitpunkt ist die vorliegende Arbeit eine der wenigen Studien, die das neuronale Differenzierungspotenzial von caninen mesenchymalen Stammzellen aus dem Fettgewebe untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass sich canine ASCs durch das hier verwendete neuronale Differenzierungsmedium morphologisch zu Neuronen-ähnlichen Zellen verändern und dass sie neuronale Marker sowie neurotrophe Faktoren exprimieren. Auch in der Immunzytochemie sind positive Expressionen der untersuchten Marker zu erkennen. Letztendlich liefert die Arbeit jedoch keinen wissenschaftlichen Beweis für die Entstehung funktioneller Neurone. Hierfür müssen in weiteren Studien Untersuchungen zu elektrophysiologischen Charakteristika der cASCs erfolgen sowie die Überprüfung der Fähigkeit der Zellen, im Zellnetzwerk miteinander zu kommunizieren.

## 6. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem neuronalen Differenzierungspotenzial caniner mesenchymaler Stammzellen aus dem Fettgewebe. Ziel der Arbeit war es, canine ASCs zunächst näher zu charakterisieren und anschließend ihre Fähigkeit, neuronal zu differenzieren, zu untersuchen. Hierfür wurden Stammzellen aus dem Fettgewebe von neun Hunden in undifferenziertem Zustand zunächst auf ihre Differenzierungsfähigkeit und ihre Expressionsmuster charakterisiert. Diese Zellen ließen sich in eine adipogene, chondrogene und osteogene Linie differenzieren. Des Weiteren waren sie positiv für die Expression der Zelloberflächenmarker CD90 und CD105. Aufgrund dessen konnten sie als Stammzellen identifiziert und für die weiteren Versuche verwendet werden. In *in vitro* Untersuchungen wurden die Zellen mithilfe eines neuronalen Induktionsmediums, bestehend aus Insulin, Forskolin, Kaliumchlorid, Butylhydroxyanisol, Valproinsäure und Hydrocortison, neuronal differenziert. Weitere Analysen der Zellen wurden zu den Zeitpunkten 3h, 24h und 72h nach Differenzierungsinduktion durchgeführt. Nicht differenzierte Zellen dienten hierbei als negativ-Kontrollgruppe. Canines Hirngewebe diente als Positivkontrolle.

Anhand von lichtmikroskopischen Untersuchungen konnte eine veränderte Morphologie der Zellen bereits nach einer Stunde Differenzierung festgestellt werden. Dabei zog sich das Zytoplasma in Richtung des Somas zusammen und bildete mehrere, zunächst primär, später auch sekundär und tertiär verzweigte Ausläufer aus. Neben der morphologischen Untersuchung erfolgte die Analyse der Genexpression neuronaler und glialer Marker. Dieser Nachweis wurde mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion durchgeführt. Untersucht wurden hierbei die Expressionsmuster der neuronalen Marker  $\beta$ -III-Tubulin, MAP2, Nestin und des glialen Markers GFAP. Ebenso erfolgte die Auswertung der Expression der Neurotrophine NGF, BDNF und GDNF. Dabei fiel auf, dass cASCs bereits in einem undifferenzierten Zustand neuronale Marker sowie alle untersuchten Neurotrophine exprimierten. Lediglich GFAP konnte weder in undifferenzierten noch in differenzierten cASCs nachgewiesen werden. Allerdings konnte die Expression aller Marker, auch eine GFAP-Expression, im caninen Hirngewebe demonstriert werden. In neuronal differenzierten Zellen zeigte sich im Differenzierungsverlauf eine veränderte Expression der Marker. Das Expressionsmuster von MAP2 stieg im Laufe der Differenzierung signifikant an. Die Expression von BDNF und GDNF stieg ebenfalls an, allerdings weniger deutlich als MAP2. NGF wurde hingegen 24h nach neuronaler Differenzierung signifikant niedriger exprimiert als nach 3h Differenzierung. Ebenso sank die Expression der Marker Nestin und  $\beta$ -III-Tubulin 24h nach Induktionsbeginn signifikant ab. Mittels Immunhistochemie konnten MAP2, Nestin,  $\beta$ -III-Tubulin, GFAP und A2B5 positiv in differenzierten sowie undifferenzierten Zellen nachgewiesen werden. Anhand des Western Blots konnte gezeigt werden, dass sich nicht

nur die mRNA in den Zellen verändert, sondern dass auch neurale Proteine innerhalb der differenzierten Zellen translatiert werden.

Die hier gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass sich canine ASCs durch eine neuronale Induktion neuronal differenzieren lassen und eine Neuronen-ähnliche Morphologie, sowie veränderte Gen- und Proteinexpressionen aufzeigen. Somit bietet diese Erkenntnis Anlass zu einer weiteren Erforschung der neuronalen Differenzierung von caninen Stammzellen aus dem Fettgewebe für einen künftigen Einsatz in der Veterinär- und Humanmedizin.

## 7. Summary

The aim of the study was to investigate the neuronal differentiation potential of canine adipose derived stem cells. For this objective, stem cells obtained from the adipose tissue of nine dogs have been isolated and cultured. First, these cells were characterized by their differentiation capacity to differentiate in adipogenic, chondrogenic and osteogenic lineages and by their positive gene expression for the surface markers CD90 and CD105. Based on these results, the isolated cells could be defined as mesenchymal stem cells. In further *in vitro* investigations, cells were differentiated with a neuronal induction medium, consisting of insulin, forskolin, potassium chloride, butylhydroxyanisole, valproic acid and hydrocortisone. Additional analyses were conducted 3h, 24h and 72h after neuronal induction. Control groups consisted of undifferentiated cells of the same donor animals. Dog brain tissue acted as main positive control. Based on microscopic analyses, morphological changes of the cells could already be noticed one hour after neuronal induction. During neuronal differentiation, cell bodies became increasingly spherical and refractile, exhibiting a typical neuronal perikaryal appearance. Processes continued to elaborate, displaying primary, secondary and at least tertiary branches and putative filopodial extensions. To further characterize neuronal differentiation, gene expression of neuronal and glial markers was analysed by quantitative polymerase chain reaction. For this, expression patterns of the neuronal genes  $\beta$ -III-tubulin, MAP2, nestin and the glial gene GFAP were investigated. In addition, expression of the neurotrophic factors NGF, BDNF and GDNF was determined. Thereby it could be noticed that neural markers and neurotrophic factors were already expressed in undifferentiated cASCs. Only expression of GFAP could not be demonstrated neither in differentiated nor in undifferentiated cells. Indeed, canine brain tissue was positive for all investigated markers, including GFAP. During the differentiation process neural differentiated cASCs showed a changed marker expression. The expression pattern of MAP2 increased significantly from 3h to 72h. Expression of BDNF and GDNF increased too, but there were no significant differences between the investigated timepoints. NGF expression decreased during neuronal differentiation likewise the markers nestin and  $\beta$ -III-tubulin. By immunocytochemistry, cells showed a positive expression for GFAP, MAP2,  $\beta$ -III-tubulin, nestin and A2B5 independently whether they were differentiated or not. Based on western blot analysis, even protein translation could be demonstrated for neuronal differentiated cASCs.

The obtained findings show the neuronal differentiation potential of canine adipose derived stem cells as proved by changed neuron-like morphology and altered gene expression. These results suggest further investigation of the neuronal differentiation potential of cASCs for a prospective application in veterinary and human medicine.

## 8. Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

---

Daniela Blecker



## 9. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold für die Überlassung des Themas, das Vertrauen und die Möglichkeit, die Arbeit im Labor seiner Arbeitsgruppe am Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie anzufertigen.

Ein großer Dank geht an Manu, die mir vor allem in den letzten Monaten sehr geholfen, mir viel erklärt und gezeigt und mich mit ihrer Arbeit unterstützt hat.

Danke an Dr. Daniela Fietz für das Korrekturlesen dieser Arbeit und für hilfreiche Tipps und Ratschläge.

Ein riesengroßes Dankeschön auch an Alena, sind wir mal ehrlich: wer weiß ob es diese Arbeit ohne dich geben würde. Danke, dass du mir gesagt hast was wichtig für mich ist, dass du mich mit aufbauenden Worten motiviert hast und dass du immer ehrlich und für mich da bist.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts gilt ebenfalls ein herzliches Dankeschön für die schöne und lustige Zeit.

Meinen Freundinnen Gianna, Feli und Julia widme ich ebenfalls einen großen Dank für gutes Zureden und generell dafür, dass ich mit euch eine schöne Zeit erleben durfte und auch in Zukunft erleben darf.

Ich danke auch meiner lieben Schwester für das Korrekturlesen und die hilfreichen Hinweise zur Verbesserung dieser Arbeit.

Mein allergrößter Dank geht aber an meinen Vater, der mir trotz Diskussionen mein Studium ermöglicht, mich in allem unterstützt und mir somit die Chance zur Anfertigung dieser Arbeit gegeben hat. Danke, dass du niemals das Vertrauen in mich verlierst und immer für mich da bist.

## 10. Literaturverzeichnis

- Abdel-Rahman, A.; Rao, M.; Shetty, A. (2004) Nestin expression in hippocampal astrocytes after injury depends on the age of the hippocampus. *Glia*. 4. 299–313.
- About, I.; Laurent-Maquin, D.; Lendahl, U.; Mitsiadis, T. (2000) Nestin expression in embryonic and adult human teeth under normal and pathological conditions. *The American journal of pathology*. 1. 287–295.
- Abramova, N.; Charniga, C.; Goderie, S.; Temple, S. (2005) Stage-specific changes in gene expression in acutely isolated mouse CNS progenitor cells. *Developmental biology*. 2. 269–281.
- Ahmed, S.; Reynolds, B.; Weiss, S. (1995) BDNF enhances the differentiation but not the survival of CNS stem cell-derived neuronal precursors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 8. 5765–5778.
- Airaksinen, M.; Titievsky, A.; Saarma, M. (1999) GDNF family neurotrophic factor signaling: four masters, one servant? *Molecular and cellular neurosciences*. 5. 313–325.
- Aizenman, Y.; Vellis, J. de (1987) Brain neurons develop in a serum and glial free environment: effects of transferrin, insulin, insulin-like growth factor-I and thyroid hormone on neuronal survival, growth and differentiation. *Brain research*. 1-2. 32–42.
- Aizenman, Y.; Weichsel, M., JR; Vellis, J. de (1986) Changes in insulin and transferrin requirements of pure brain neuronal cultures during embryonic development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 7. 2263–2266.
- Altman, J.; Das, G. (1966) Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. *The Journal of comparative neurology*. 3. 337–389.
- Anthony, T.; Klein, C.; Fishell, G.; Heintz, N. (2004) Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system. *Neuron*. 6. 881–890.
- Arenas, E.; Trupp, M.; Akerud, P.; Ibanez, C. (1995) GDNF prevents degeneration and promotes the phenotype of brain noradrenergic neurons in vivo. *Neuron*. 6. 1465–1473.
- Arnhold, S.; Wenisch, S. (2015) Adipose tissue derived mesenchymal stem cells for musculoskeletal repair in veterinary medicine. *American journal of stem cells*. 1. 1–12.
- Arnhold, S.; Goletz, I.; Klein, H.; Stumpf, G.; Beluche, L.; Rohde, C.; Addicks, K.; Litzke, L. (2007) Isolation and characterization of bone marrow-derived equine mesenchymal stem cells. *American journal of veterinary research*. 10. 1095–1105.
- Bally-Cuif, L.; Hammerschmidt, M. (2003) Induction and patterning of neuronal development, and its connection to cell cycle control. *Current opinion in neurobiology*. 1. 16–25.
- Bamji, S.; Majdan, M.; Pozniak, C.; Belliveau, D.; Aloyz, R.; Kohn, J. (1998) The p75 neurotrophin receptor mediates neuronal apoptosis and is essential for naturally occurring sympathetic neuron death. *The Journal of cell biology*. 4. 911–923.
- Barbacid, M. (1995) Structural and functional properties of the TRK family of neurotrophin receptors. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 442–458.
- Barde, Y. (1989) Trophic factors and neuronal survival. *Neuron*. 6. 1525–1534.
- Barde, Y.; Edgar, D.; Thoenen, H. (1982) Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *The EMBO journal*. 5. 549–553.

- Barres, B. (1999) A new role for glia: generation of neurons! *Cell*. 6. 667–670.
- Bartholomew, A.; Sturgeon, C.; Siatskas, M.; Ferrer, K.; McIntosh, K.; Patil, S. (2002) Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Experimental hematology*. 1. 42–48.
- Beck, K.; Valverde, J.; Alexi, T.; Poulsen, K.; Moffat, B.; Vandlen, R. (1995) Mesencephalic dopaminergic neurons protected by GDNF from axotomy-induced degeneration in the adult brain. *Nature*. 6512. 339–341.
- Bedard, A.; Cossette, M.; Levesque, M.; Parent, A. (2002) Proliferating cells can differentiate into neurons in the striatum of normal adult monkey. *Neuroscience letters*. 3. 213–216.
- Bennett, L.; Cai, J.; Enikolopov, G.; Iacovitti, L. (2010) Heterotopically transplanted CVO neural stem cells generate neurons and migrate with SVZ cells in the adult mouse brain. *Neuroscience letters*. 1. 1–6.
- Benraiss, A.; Chmielnicki, E.; Lerner, K.; Roh, D.; Goldman, S. (2001) Adenoviral brain-derived neurotrophic factor induces both neostriatal and olfactory neuronal recruitment from endogenous progenitor cells in the adult forebrain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 17. 6718–6731.
- Bernardo, A.; Barrow, J.; Hay, C.; McCreath, K.; Kind, A.; Schnieke, A. (2006) Presence of endocrine and exocrine markers in EGFP-positive cells from the developing pancreas of a nestin/EGFP mouse. *Molecular and cellular endocrinology*. 1-2. 14–21.
- Bernier, P.; Bedard, A.; Vinet, J.; Levesque, M.; Parent, A. (2002) Newly generated neurons in the amygdala and adjoining cortex of adult primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 17. 11464–11469.
- Bertelli, E.; Regoli, M.; Fonzi, L.; Occhini, R.; Mannucci, S.; Ermini, L. (2007) Nestin expression in adult and developing human kidney. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*. 4. 411–421.
- Bischofberger, J.; Schmidt-Hieber, C. (2006) Adulte Neurogenese im Hippokampus. *Neuroforum* (Perspektiven der Hirnforschung), Organ der Neurowissenschaftlichen Gesellschaft. 3.06. 212–222.
- Bito, H.; Furuyashiki, T.; Ishihara, H.; Shibasaki, Y.; Ohashi, K.; Mizuno, K. (2000) A critical role for a Rho-associated kinase, p160ROCK, in determining axon outgrowth in mammalian CNS neurons. *Neuron*. 2. 431–441.
- Black, L.; Gaynor, J.; Gahring, D.; Adams, C.; Aron, D.; Harman, S. (2007) Effect of adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on lameness in dogs with chronic osteoarthritis of the coxofemoral joints: a randomized, double-blinded, multicenter, controlled trial. *Veterinary therapeutics : research in applied veterinary medicine*. 4. 272–284.
- Borjesson, D.; Peroni, J. (2011) The regenerative medicine laboratory: facilitating stem cell therapy for equine disease. *Clinics in laboratory medicine*. 1. 109–123.
- Brazelton, T.; Rossi, F.; Keshet, G.; Blau, H. (2000) From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science (New York, N.Y.)*. 5497. 1775–1779.
- Brohlin, M.; Kingham, P.; Novikova, L.; Novikov, L.; Wiberg, M. (2012) Aging effect on neurotrophic activity of human mesenchymal stem cells. *PloS one*. 7(9): e45052.
- Bruder, S.; Jaiswal, N.; Haynesworth, S. (1997) Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *Journal of cellular biochemistry*. 2. 278–294.
- Brundin, P.; Bjorklund, A. (1998) Survival of expanded dopaminergic precursors is critical for clinical trials. *Nature neuroscience*. 7. 537.
- Brundin, P.; Strecker, R.; Widner, H.; Clarke, D.; Nilsson, O.; Astedt, B. (1988) Human fetal dopamine neurons grafted in a rat model of Parkinson's disease: immunological aspects,

spontaneous and drug-induced behaviour, and dopamine release. *Experimental brain research*. 1. 192–208.

Buffo, A.; Rite, I.; Tripathi, P.; Lepier, A.; Colak, D.; Horn, A.-P. (2008) Origin and progeny of reactive gliosis: A source of multipotent cells in the injured brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 9. 3581–3586.

Bunnell, B.; Flaat, M.; Gagliardi, C.; Patel, B.; Ripoll, C. (2008) Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods (San Diego, Calif.)*. 2. 115–120.

Cambray-Deakin, M.; Morgan, A.; Burgoyne, R. (1987) Sequential appearance of cytoskeletal components during the early stages of neurite outgrowth from cerebellar granule cells in vitro. *Brain research*. 1-2. 197–207.

Campagnoli, C.; Roberts, I.; Kumar, S.; Bennett, P.; Bellantuono, I.; Fisk, N. (2001) Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*. 8. 2396–2402.

Canzoniere, D.; Farioli-Vecchioli, S.; Conti, F.; Ciotti, M.; Tata, A.; Augusti-Tocco, G. (2004) Dual control of neurogenesis by PC3 through cell cycle inhibition and induction of Math1. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 13. 3355–3369.

Caplan, A. (1991) Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society*. 5. 641–650.

Caplan, A.; Dennis, J. (2006) Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *Journal of cellular biochemistry*. 5. 1076–1084.

Casaccia-Bonnet, P.; Kong, H.; Chao, M. (1998) Neurotrophins: the biological paradox of survival factors eliciting apoptosis. *Cell death and differentiation*. 5. 357–364.

Cattaneo, E.; McKay, R. (1990) Proliferation and differentiation of neuronal stem cells regulated by nerve growth factor. *Nature*. 6295. 762–765.

Chamberlain, G.; Fox, J.; Ashton, B.; Middleton, J. (2007) Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 11. 2739–2749.

Chao, M. (2003) Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nature reviews. Neuroscience*. 4. 299–309.

Chen, X.; Li, Y.; Wang, L.; Katakowski, M.; Zhang, L.; Chen, J. (2002) Ischemic rat brain extracts induce human marrow stromal cell growth factor production. *Neuropathology: official journal of the Japanese Society of Neuropathology*. 4. 275–279.

Chu, C.; Szczodry, M.; Bruno, S. (2010) Animal models for cartilage regeneration and repair. *Tissue engineering*. 1. 105–115.

Chung, C.-S.; Fujita, N.; Kawahara, N.; Yui, S.; Nam, E.; Nishimura, R. (2013) A comparison of neurosphere differentiation potential of canine bone marrow-derived mesenchymal stem cells and adipose-derived mesenchymal stem cells. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*. 7. 879–886.

Chung, Y.; Klimanskaya, I.; Becker, S.; Marh, J.; Lu, S.-J.; Johnson, J. (2006) Embryonic and extraembryonic stem cell lines derived from single mouse blastomeres. *Nature*. 7073. 216–219.

Clarke, S.; Shetty, A.; Bradley, J.; Turner, D. (1994) Reactive astrocytes express the embryonic intermediate neurofilament nestin. *Neuroreport*. 15. 1885–1888.

Cremisi, F.; Philpott, A.; Ohnuma, S. (2003) Cell cycle and cell fate interactions in neural development. *Current opinion in neurobiology*. 1. 26–33.

- Csaki, C.; Matis, U.; Mobasheri, A.; Ye, H.; Shakibaei, M. (2007) Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells: a biochemical, morphological and ultrastructural study. *Histochemistry and cell biology*. 6. 507–520.
- Davidoff, M.; Middendorff, R.; Enikolopov, G.; Riethmacher, D.; Holstein, A.; Muller, D. (2004) Progenitor cells of the testosterone-producing Leydig cells revealed. *The Journal of cell biology*. 5. 935–944.
- Davis, A.; Temple, S. (1994) A self-renewing multipotential stem cell in embryonic rat cerebral cortex. *Nature*. 6503. 263–266.
- Deng, W.; Obrocka, M.; Fischer, I.; Prockop, D. (2001) In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. *Biochemical and biophysical research communications*. 1. 148–152.
- Di Nicola, M.; Carlo-Stella, C.; Magni, M.; Milanese, M.; Longoni, P.; Matteucci, P. (2002) Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. 10. 3838–3843.
- Di Rocco, G.; Iachininoto, M.; Tritarelli, A.; Straino, S.; Zacheo, A.; Germani, A.; Crea, F.; Capogrossi, M. (2006) Myogenic potential of adipose-tissue-derived cells. *Journal of cell science*. 14. 2945–2952.
- Dietrich, J.; Noble, M.; Mayer-Proschel, M. (2002) Characterization of A2B5+ glial precursor cells from cryopreserved human fetal brain progenitor cells. *Glia*. 40. 65–77.
- Digirolamo, C.; Stokes, D.; Colter, D.; Phinney, D.; Class, R.; Prockop, D. (1999) Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *British journal of haematology*. 2. 275–281.
- Dinsmore, J.; Solomon, F. (1991) Inhibition of MAP2 expression affects both morphological and cell division phenotypes of neuronal differentiation. *Cell*. 4. 817–826.
- Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.; Krause, D. (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 4. 315–317.
- Edamura, K.; Kuriyama, K.; Kato, K.; Nakano, R.; Teshima, K.; Asano, K. (2012) Proliferation capacity, neuronal differentiation potency and microstructures after the differentiation of canine bone marrow stromal cells into neurons. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*. 7. 923–927.
- Eng, L.; Ghimikar, R.; Lee, Y. (2000) Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochemical research*. 9-10. 1439–1451.
- Eng, L.; Vanderhaeghen, J.; Bignami, A.; Gerstl, B. (1971). An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain research*. 2. 351–354.
- Erb, K.; Pfeil, I.; Schneider, S.; Bader, A. (2011) Interventionelle Stammzelltherapie: Anwendungsbeispiel an akuten Rückenmarkstramen mit negativer Tiefensensibilität. In: 57. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Kleintiermedizin 2011.
- Erickson, G.; Gimble, J.; Franklin, D.; Rice, H.; Awad, H.; Guilak, F. (2002) Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochemical and biophysical research communications*. 2. 763–769.
- Eriksson, P.; Perfilieva, E.; Bjork-Eriksson, T.; Alborn, A.; Nordborg, C.; Peterson, D. (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature medicine*. 11. 1313–1317.
- Fanarraga, M.; Avila, J.; Zabala, J. (1999) Expression of unphosphorylated class III beta-tubulin isotype in neuroepithelial cells demonstrates neuroblast commitment and differentiation. *European Journal of Neuroscience*. 2. 517–27.

- Farina, V.; Zedda, M.; Bianchi, M.; Marongiu, P.; Riu, P. de (1999) Tubulin isoforms are differently expressed in developing and mature neurons: a study on the cerebral cortex of newborn and adult rats. *European journal of histochemistry*. 4. 285–291.
- Ferreira, A.; Caceres, A. (1992) Expression of the class III beta-tubulin isotype in developing neurons in culture. *Journal of neuroscience research*. 4. 516–529.
- Filioli Uranio, M.; Valentini, L.; Lange-Consiglio, A.; Caira, M.; Guaricci, A.; L'Abbate, A.; Catacchio, C. (2011) Isolation, proliferation, cytogenetic, and molecular characterization and in vitro differentiation potency of canine stem cells from foetal adnexa: a comparative study of amniotic fluid, amnion, and umbilical cord matrix. *Molecular reproduction and development*. 5. 361–373.
- Filippov, V.; Kronenberg, G.; Pivneva, T.; Reuter, K.; Steiner, B.; Wang, L. (2003) Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Molecular and cellular neurosciences*. 3. 373–382.
- Flax, J.; Aurora, S.; Yang, C.; Simonin, C.; Wills, A.; Billingham, L. (1998) Engraftable human neural stem cells respond to developmental cues, replace neurons, and express foreign genes. *Nature biotechnology*. 11. 1033–1039.
- Fortier, L.; Travis, A. (2011) Stem cells in veterinary medicine. *Stem cell research & therapy*. 1. 9.
- Foudah, D.; Monfrini, M.; Donzelli, E.; Niada, S.; Brini, A.; Orciani, M. (2014) Expression of neural markers by undifferentiated mesenchymal-like stem cells from different sources. *Journal of immunology research*. 987678. 16 pages.
- Foudah, D.; Redondo, J.; Caldara, C.; Carini, F.; Tredici, G.; Miloso, M. (2013) Human mesenchymal stem cells express neuronal markers after osteogenic and adipogenic differentiation. *Cellular & molecular biology letters*. 2. 163–186.
- Fraser, J.; Wulur, I.; Alfonso, Z.; Hedrick, M. (2006) Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends in biotechnology*. 4. 150–154.
- Friedenstein, A.; Gorskaja, J.; Kulagina, N. (1976) Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experimental hematology*. 5. 267–274.
- Frojdman, K.; Pelliniemi, L.; Lendahl, U.; Virtanen, I.; Eriksson, J. (1997) The intermediate filament protein nestin occurs transiently in differentiating testis of rat and mouse. *Differentiation; research in biological diversity*. 4. 243–249.
- Fuchs, E.; Cleveland, D. (1998) A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science (New York, N.Y.)*. 5350. 514–519.
- Fujioka, T.; Fujioka, A.; Duman, R. (2004) Activation of cAMP signaling facilitates the morphological maturation of newborn neurons in adult hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2. 319–328.
- Fukuda, S.; Kato, F.; Tozuka, Y.; Yamaguchi, M.; Miyamoto, Y.; Hisatsune, T. (2003) Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 28. 9357–9366.
- Gage, F. (2000) Mammalian neural stem cells. *Science (New York, N.Y.)*. 5457. 1433–1438.
- Gage, F.; Coates, P.; Palmer, T.; Kuhn, H.; Fisher, L.; Suhonen, J. (1995) Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 25. 11879–11883.
- Galli, R.; Borello, U.; Gritti, A.; Minasi, M.; Bjornson, C.; Coletta, M. (2000) Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells. *Nature neuroscience*. 10. 986–991.
- Garcia-Castro, M.; Bronner-Fraser, M. (1999) Induction and differentiation of the neural crest. *Current opinion in cell biology*. 6. 695–698.

- Gardner, R.; Johnson, M. (1973) Investigation of early mammalian development using interspecific chimaeras between rat and mouse. *Nature: New biology*. 151. 86–89.
- Ge, S.; Goh, E.; Sailor, K.; Kitabatake, Y.; Ming, G.-I.; Song, H. (2006) GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature*. 7076. 589–593.
- Gimble, J.; Guilak, F. (2003) Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy*. 5. 362–369.
- Goedert, M.; Crowther, R.; Garner, C. (1991) Molecular characterization of microtubule-associated proteins tau and MAP2. *Trends in neurosciences*. 5. 193–199.
- Golden, J.; DeMaro, J.; Osborne, P.; Milbrandt, J.; Johnson, E., JR (1999) Expression of neurturin, GDNF, and GDNF family-receptor mRNA in the developing and mature mouse. *Experimental neurology*. 2. 504–528.
- Goldman, R.; Grin, B.; Mendez, M.; Kuczmarski, E. (2008) Intermediate filaments: versatile building blocks of cell structure. *Current opinion in cell biology*. 1. 28–34.
- Gottlicher, M.; Minucci, S.; Zhu, P.; Kramer, O.; Schimpf, A.; Giavara, S. (2001) Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *The EMBO journal*. 24. 6969–6978.
- Gould, T.; Enomoto, H. (2009) Neurotrophic modulation of motor neuron development. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*. 1. 105–116.
- Gregg, C.; Chojnacki, A.; Weiss, S. (2002) Radial glial cells as neuronal precursors: the next generation? *Journal of neuroscience research*. 6. 708–713.
- Gronthos, S.; Franklin, D.; Leddy, H.; Robey, P.; Storms, R.; Gimble, J. (2001) Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *Journal of cellular physiology*. 1. 54–63.
- Guercio, A.; Di Marco, P.; Casella, S.; Cannella, V.; Russotto, L.; Purpari, G. (2012) Production of canine mesenchymal stem cells from adipose tissue and their application in dogs with chronic osteoarthritis of the humeroradial joints. *Cell biology international*. 2. 189–194.
- Gussoni, E.; Soneoka, Y.; Strickland, C.; Buzney, E.; Khan, M.; Flint, A. (1999) Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature*. 6751. 390–394.
- Haendel, M.; Bollinger, K.; Baas, P. (1996) Cytoskeletal changes during neurogenesis in cultures of avian neural crest cells. *Journal of neurocytology*. 4. 289–301.
- Hall, P.; Watt, F. (1989) Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. *Development (Cambridge, England)*. 4. 619–633.
- Halliday, H.; Ehrenkranz, R.; Doyle, L. (2009) Early (< 8 days) postnatal corticosteroids for preventing chronic lung disease in preterm infants. *The Cochrane database of systematic reviews*. 1. CD001146.
- Halvorsen, Y.; Wilkison, W.; Gimble, J. (2000) Adipose-derived stromal cells-their utility and potential in bone formation. *International journal of obesity and related metabolic disorders: journal of the International Association for the Study of Obesity*. 4. 41–4.
- Hamburger, V. (1958) Regression versus peripheral control of differentiation in motor hypoplasia. *The American journal of anatomy*. 3. 365–409.
- Hamburger, V.; Levi-Montalcini, R. (1949) Proliferation, differentiation and degeneration in the spinal ganglia of the chick embryo under normal and experimental conditions. *The Journal of experimental zoology*. 3. 457–501.
- Haubensak, W.; Attardo, A.; Denk, W.; Huttner, W. (2004) Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis.

*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 9. 3196–3201.

Haynesworth, S.; Baber, M.; Caplan, A. (1992) Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone*. 1. 69–80.

Henderson, C.; Phillips, H.; Pollock, R.; Davies, A.; Lemeulle, C.; Armanini, M. (1994) GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. *Science (New York, N.Y.)*. 5187. 1062–1064.

Hirokawa, N.; Hisanaga, S.; Shiomura, Y. (1988) MAP2 is a component of crossbridges between microtubules and neurofilaments in the neuronal cytoskeleton: quick-freeze, deep-etch immunoelectron microscopy and reconstitution studies. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 8. 2769–2779.

Hiyama, A.; Mochida, J.; Iwashina, T.; Omi, H.; Watanabe, T.; Serigano, K. (2008) Transplantation of mesenchymal stem cells in a canine disc degeneration model. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 5. 589–600.

Hockfield, S.; McKay, R. (1985) Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 12. 3310–3328.

Hofstetter, C.; Schwarz, E.; Hess, D.; Widenfalk, J.; El Manira, A.; Prockop, D. (2002) Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 4. 2199–2204.

Hsieh, J.; Nakashima, K.; Kuwabara, T.; Mejia, E.; Gage, F. (2004) Histone deacetylase inhibition-mediated neuronal differentiation of multipotent adult neural progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 47. 16659–16664.

Huang, E.; Reichardt, L. (2001) Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annual review of neuroscience*. 24. 677–736.

Hüsing, B.; Engel, E.; Frietsch, R.; Zimmer, R.; Gaisser, S.; Menrad, K. (2003) Menschliche Stammzellen. Studie des Zentrums für Technologiefolgen-Abschätzung. TA-Swiss. 44.

Iacopetti, P.; Barsacchi, G.; Tirone, F.; Maffei, L.; Cremisi, F. (1994) Developmental expression of PC3 gene is correlated with neuronal cell birthday. *Mechanisms of development*. 2. 127–137.

In 't Anker, Pieterella S.; Scherjon, S.; Kleijburg-van der Keur, C.; Noort, W.; Claas, F.; Willemze, R.; Fibbe, W. (2003) Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood*. 4. 1548–1549.

Javazon, E.; Beggs, K.; Flake, A. (2004) Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Experimental hematology*. 5. 414–425.

Jenuwein, T.; Allis, C. (2001) Translating the histone code. *Science (New York, N.Y.)*. 5532. 1074–1080.

Jessell, T. (2000) Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nature reviews. Genetics*. 1. 20–29.

Jin, K.; Mao, X.; Batteur, S.; Sun, Y.; Greenberg, D. (2003) Induction of neuronal markers in bone marrow cells: differential effects of growth factors and patterns of intracellular expression. *Experimental neurology*. 1. 78–89.

Jin, K.; Peel, A.; Mao, X.; Xie, L.; Cottrell, B.; Henshall, D. (2004) Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1. 343–347.



- Johansson, C.; Momma, S.; Clarke, D.; Risling, M.; Lendahl, U.; Frisen, J. (1999) Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell*. 1. 25–34.
- Jung, G.-A.; Yoon, J.-Y.; Moon, B.-S.; Yang, D.-H.; Kim, H.-Y.; Lee, S.-H. (2008) Valproic acid induces differentiation and inhibition of proliferation in neural progenitor cells via the beta-catenin-Ras-ERK-p21Cip/WAF1 pathway. *BMC cell biology*. 9:66.
- Kadiyala, S.; Young, R.; Thiede, M.; Bruder, S. (1997) Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell transplantation*. 2. 125–134.
- Kalchauer, C. (2000) Mechanisms of early neural crest development: from cell specification to migration. *International review of cytology*. 200. 143–196.
- Kamishina, H.; Deng, J.; Oji, T.; Cheeseman, J.; Clemmons, R. (2006) Expression of neural markers on bone marrow-derived canine mesenchymal stem cells. *American journal of veterinary research*. 11. 1921–1928.
- Kamphuis, W.; Mamber, C.; Moeton, M.; Kooijman, L.; Sluijs, J.; Jansen, A. (2012) GFAP isoforms in adult mouse brain with a focus on neurogenic astrocytes and reactive astrogliosis in mouse models of Alzheimer disease. *PloS one*. 8. e42823.
- Kang, B.-J.; Ryu, H.-H.; Park, S.; Koyama, Y.; Kikuchi, M.; Woo, H.-M. (2012) Comparing the osteogenic potential of canine mesenchymal stem cells derived from adipose tissues, bone marrow, umbilical cord blood, and Wharton's jelly for treating bone defects. *Journal of Veterinary Science*. 3. 299–310.
- Katsetos, C.; Frankfurter, A.; Christakos, S.; Mancall, E.; Vlachos, I.; Urich, H. (1993) Differential localization of class III, beta-tubulin isotype and calbindin-D28k defines distinct neuronal types in the developing human cerebellar cortex. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 6. 655–666.
- Katsetos, C.; Herman, M.; Frankfurter, A.; Uffer, S.; Perentes, E.; Rubinstein, L. (1991) Neuron-associated class III beta-tubulin isotype, microtubule-associated protein 2, and synaptophysin in human retinoblastomas in situ. Further immunohistochemical observations on the Flexner-Wintersteiner rosettes. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1. 45–54.
- Katsetos, C.; Kontogeorgos, G.; Geddes, J.; Herman, M.; Tsimara-Papastamatiou, H.; Yu, Y. (2000) Differential distribution of the neuron-associated class III beta-tubulin in neuroendocrine lung tumors. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 4. 535–544.
- Katsetos, C.; Del Valle, L.; Geddes, J.; Aldape, K.; Boyd, J.; Legido, A. (2002) Localization of the neuronal class III beta-tubulin in oligodendrogliomas: comparison with Ki-67 proliferative index and 1p/19q status. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 4. 307–320.
- Katsetos, C.; Legido, A.; Perentes, E.; Mork, S. (2003) Class III beta-tubulin isotype: a key cytoskeletal protein at the crossroads of developmental neurobiology and tumor neuropathology. *Journal of child neurology*. 12. 851–66.
- Kennea, N.; Mehmet, H. (2002) Neural stem cells. *The Journal of pathology*. 4. 536–550.
- Kettenmann, H.; Verkhratsky, A. (2011) Neuroglia--living nerve glue. *Fortschritte der Neurologie-Psychiatrie*. 10. 588–597.
- Kiefer, K.; Pluhar, G.; Conzemius, M.; O'Brien, T. (2014) The Influence of Culture Medium Type on Cellular Phenotype of Canine Adipose Derived Stem Cells. *Open Journal of Regenerative Medicine*. 3. 28–37
- Kim, B.; Seo, J.; Bubien, J.; Oh, Y. (2002) Differentiation of adult bone marrow stem cells into neuroprogenitor cells in vitro. *Neuroreport*. 9. 1185–1188.

- Kim, E.; Lee, K.-B.; Yu, J.; Lee, J.; Kim, K.; Han, K.-W. (2014) Neuronal cell differentiation of mesenchymal stem cells originating from canine amniotic fluid. *Human cell*. 2. 51–58.
- Kim, G.; Oh, H.; Lee, T.; Lee, J.; Oh, S.; Lee, J. (2014) Effect of culture medium type on canine adipose-derived mesenchymal stem cells and developmental competence of interspecies cloned embryos. *Theriogenology*. 2. 243–249.
- Kisiel, A.; McDuffee, L.; Masaoud, E.; Bailey, T.; Esparza Gonzalez, B.; Nino-Fong, R. (2012) Isolation, characterization, and in vitro proliferation of canine mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, muscle, and periosteum. *American journal of veterinary research*. 8. 1305–1317.
- Klein, T.; Ling, Z.; Heimberg, H.; Madsen, O.; Heller, R.; Serup, P. (2003) Nestin is expressed in vascular endothelial cells in the adult human pancreas. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 6. 697–706.
- Knaus, P.; Betz, H.; Rehm, H. (1986) Expression of synaptophysin during postnatal development of the mouse brain. *Journal of neurochemistry*. 4. 1302–1304.
- Kohyama, J.; Abe, H.; Shimazaki, T.; Koizumi, A.; Nakashima, K.; Gojo, S. (2001) Brain from bone: efficient "meta-differentiation" of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent. *Differentiation; research in biological diversity*. 4-5. 235–244.
- Kopen, G.; Prockop, D.; Phinney, D. (1999) Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 19. 10711–10716.
- Korsching, S. (1993) The neurotrophic factor concept: a reexamination. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 7. 2739–2748.
- Kotton, D.; Fine, A. (2003) Derivation of lung epithelium from bone marrow cells. *Cytotherapy*. 2. 169–173.
- Kurihara, Y.; Suzuki, T.; Sakaue, M.; Murayama, O.; Miyazaki, Y.; Onuki, A. (2014) Valproic acid, a histone deacetylase inhibitor, decreases proliferation of and induces specific neurogenic differentiation of canine adipose tissue-derived stem cells. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*. 1. 15–23.
- Lee, K.; Kang, H.; Lee, H.; Kim, H.-J.; Kim, C.-L.; Song, J.-Y. (2014) Sequential sub-passage decreases the differentiation potential of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. *Research in veterinary science*. 2. 267–275.
- Lee, K.; Hui, J.; Im Song, C.; Ardany, L.; Lee, E. (2007) Injectable mesenchymal stem cell therapy for large cartilage defects--a porcine model. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 11. 2964–2971.
- Lee, M.; Tuttle, J.; Rebhun, L.; Cleveland, D.; Frankfurter, A. (1990) The expression and posttranslational modification of a neuron-specific beta-tubulin isotype during chick embryogenesis. *Cell motility and the cytoskeleton*. 2. 118–132.
- Lendahl, U.; Zimmerman, L.; McKay, R. (1990) CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*. 4. 585–595.
- Lepski, G.; Jannes, C.; Nikkhah, G.; Bischofberger, J. (2013) cAMP promotes the differentiation of neural progenitor cells in vitro via modulation of voltage-gated calcium channels. *Frontiers in cellular neuroscience*. 7:155.
- Levi-Montalcini, R. (1987) The nerve growth factor 35 years later. *Science (New York, N.Y.)*. 4819. 1154–1162.
- Levi-Montalcini, R.; Dal Toso, R.; Della Valle, F.; Skaper, S.; Leon, A. (1995) Update of the NGF saga. *Journal of the neurological sciences*. 2. 119–127.

- Lewin, G.; Barde, Y. (1996) Physiology of the neurotrophins. *Annual review of neuroscience*. 19: 289–317.
- Li, Y.-C.; Tsai, L.-K.; Wang, J.-H.; Young, T.-H. (2014) A neural stem/precursor cell monolayer for neural tissue engineering. *Biomaterials*. 4. 1192–1204.
- Lin, L.; Doherty, D.; Lile, J.; Bektesh, S.; Collins, F. (1993) GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science (New York, N.Y.)*. 5111. 1130–1132.
- Lin, Y.; Luo, E.; Chen, X.; Liu, L.; Qiao, J.; Yan, Z. (2005) Molecular and cellular characterization during chondrogenic differentiation of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and cartilage formation in vivo. *Journal of cellular and molecular medicine*. 4. 929–939.
- Liu, T.; Martina, M.; Hutmacher, D.; Hui, J.; Lee, E.; Lim, B. (2007) Identification of common pathways mediating differentiation of bone marrow- and adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells into three mesenchymal lineages. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 3. 750–760.
- Lohof, A.; Ip, N.; Poo, M. (1993) Potentiation of developing neuromuscular synapses by the neurotrophins NT-3 and BDNF. *Nature*. 6427. 350–353.
- Long, X.; Olszewski, M.; Huang, W.; Kletzel, M. (2005) Neural cell differentiation in vitro from adult human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem cells and development*. 1. 65–69.
- Lu, B.; Pang, P.; Woo, N. (2005) The yin and yang of neurotrophin action. *Nature reviews. Neuroscience*. 8. 603–614.
- Lu, P.; Blesch, A.; Tuszynski, M. (2004) Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artifact? *Journal of neuroscience research*. 2. 174–191.
- Ludueno, R. (1998) Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications. *International review of cytology*. 187: 207–275.
- Lv, L.; Han, X.; Sun, Y.; Wang, X.; Dong, Q. (2012) Valproic acid improves locomotion in vivo after SCI and axonal growth of neurons in vitro. *Experimental neurology*. 2. 783–790.
- Mackay, A.; Beck, S.; Murphy, J.; Barry, F.; Chichester, C.; Pittenger, M. (1998) Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue engineering*. 4. 415–428.
- Maltman, D.; Hardy, S.; Przyborski, S. (2011) Role of mesenchymal stem cells in neurogenesis and nervous system repair. *Neurochemistry international*. 3. 347–356.
- Mamber, C.; Kamphuis, W.; Haring, N.; Peprah, N.; Middeldorp, J.; Hol, E. (2012) GFAPdelta expression in glia of the developmental and adolescent mouse brain. *PloS one*. 12. e52659.
- Martin, D.; Cox, N.; Hathcock, T.; Niemeyer, G.; Baker, H. (2002) Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. *Experimental hematology*. 8. 879–886.
- Martinello, T.; Bronzini, I.; Maccatrozzo, L.; Mollo, A.; Sampaolesi, M.; Mascarello, F. (2011) Canine adipose-derived-mesenchymal stem cells do not lose stem features after a long-term cryopreservation. *Research in veterinary science*. 1. 18–24.
- Mattos Carvalho, A. de; Alves, A.; Golim, M.; Moroz, A.; Hussni, C.; de Oliveira, Patricia Galvao Gomes; Deffune, E. (2009) Isolation and immunophenotypic characterization of mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2-4. 303–306.
- Mazzini, L.; Mareschi, K.; Ferrero, I.; Vassallo, E.; Oliveri, G.; Boccaletti, R. (2006) Autologous mesenchymal stem cells: clinical applications in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurological research*. 5. 523–526.

- Memon, I.; Sawa, Y.; Miyagawa, S.; Taketani, S.; Matsuda, H. (2005) Combined autologous cellular cardiomyoplasty with skeletal myoblasts and bone marrow cells in canine hearts for ischemic cardiomyopathy. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 3. 646–653.
- Merkle, F.; Alvarez-Buylla, A. (2006) Neural stem cells in mammalian development. *Current opinion in cell biology*. 6. 704–709.
- Mezey, E.; Chandross, K.; Harta, G.; Maki, R.; McKercher, S. (2000) Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science (New York, N.Y.)*. 5497. 1779–1782.
- Mignone, J.; Kukekov, V.; Chiang, A.-S.; Steindler, D.; Enikolopov, G. (2004) Neural stem and progenitor cells in nestin-GFP transgenic mice. *The Journal of comparative neurology*. 3. 311–324.
- Mizuno, H.; Zuk, P.; Zhu, M.; Lorenz, H.; Benhaim, P.; Hedrick, M. (2002) Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plastic and reconstructive surgery*. 1. 199-209; discussion 210-1.
- Mokbel, A.; El Tookhy, O.; Shamaa, A.; Rashed, L.; Sabry, D.; El Sayed, A. (2011) Homing and reparative effect of intra-articular injection of autologous mesenchymal stem cells in osteoarthritic animal model. *BMC musculoskeletal disorders*. 12.259.
- Mujtaba, T.; Piper, D.; Kalyani, A.; Groves, A.; Lucero, M.; Rao, M. (1999) Lineage-restricted neural precursors can be isolated from both the mouse neural tube and cultured ES cells. *Developmental biology*. 1. 113–127.
- Munoz-Elias, G.; Woodbury, D.; Black, I. (2003) Marrow stromal cells, mitosis, and neuronal differentiation: stem cell and precursor functions. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 4. 437–448.
- Murphy, B.; Inder, T.; Huppi, P.; Warfield, S.; Zientara, G.; Kikinis, R. (2001) Impaired cerebral cortical gray matter growth after treatment with dexamethasone for neonatal chronic lung disease. *Pediatrics*. 2. 217–221.
- Nakagami, H.; Morishita, R.; Maeda, K.; Kikuchi, Y.; Ogihara, T.; Kaneda, Y. (2006) Adipose tissue-derived stromal cells as a novel option for regenerative cell therapy. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. 2. 77–81.
- Nakahara, H.; Dennis, J.; Bruder, S.; Haynesworth, S.; Lennon, D.; Caplan, A. (1991) In vitro differentiation of bone and hypertrophic cartilage from periosteal-derived cells. *Experimental cell research*. 2. 492–503.
- Nelson, T.; Alkon, D. (2005) Insulin and cholesterol pathways in neuronal function, memory and neurodegeneration. *Biochemical Society transactions*. 5. 1033–1036.
- Nemoto, K.; Fukamachi, K.; Nemoto, F.; Miyata, S.; Hamada, M.; Nakamura, Y. (1998) Gene expression of neurotrophins and their receptors in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 1. 284–288.
- Neuhuber, B.; Gallo, G.; Howard, L.; Kostura, L.; Mackay, A.; Fischer, I. (2004) Reevaluation of in vitro differentiation protocols for bone marrow stromal cells: disruption of actin cytoskeleton induces rapid morphological changes and mimics neuronal phenotype. *Journal of neuroscience research*. 2. 192–204.
- Neupane, M.; Chang, C.-C.; Kiupel, M.; Yuzbasiyan-Gurkan, V. (2008) Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. *Tissue engineering*. 6. 1007–1015.
- Nicaise, C.; Mitrecic, D.; Pochet, R. (2011) Brain and spinal cord affected by amyotrophic lateral sclerosis induce differential growth factors expression in rat mesenchymal and neural stem cells. *Neuropathology and applied neurobiology*. 2. 179–188.

- Nikoletopoulou, V.; Lickert, H.; Frade, J.; Rencurel, C.; Giallonardo, P.; Zhang, L. (2010) Neurotrophin receptors TrkA and TrkC cause neuronal death whereas TrkB does not. *Nature*. 7311. 59–63.
- Ninomiya, E.; Hattori, T.; Toyoda, M.; Umezawa, A.; Hamazaki, T.; Shintaku, H. (2014) Glucocorticoids promote neural progenitor cell proliferation derived from human induced pluripotent stem cells. *SpringerPlus*. 3:527.
- Noctor, S.; Flint, A.; Weissman, T.; Dammerman, R.; Kriegstein, A. (2001) Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature*. 6821. 714–720.
- Nohroudi, K.; Arnhold, S.; Berhorn, T.; Addicks, K.; Hoehn, M.; Himmelreich, U. (2010) In vivo MRI stem cell tracking requires balancing of detection limit and cell viability. *Cell transplantation*. 4. 431–441.
- Northcutt, R. (1989) Body and Brain. A Trophic Theory of Neural Connections. Dale Purves. Harvard University Press, Cambridge, MA, 231 *Science (New York, N. Y.)* 4907. 993.
- Oda, Y.; Tani, K.; Kanei, T.; Haraguchi, T.; Itamoto, K.; Nakazawa, H. (2013) Characterization of neuron-like cells derived from canine bone marrow stromal cells. *Veterinary Research Communications*. 2. 133–138.
- Ogawa, Y.; Sawamoto, K.; Miyata, T.; Miyao, S.; Watanabe, M.; Nakamura, M. (2002) Transplantation of in vitro-expanded fetal neural progenitor cells results in neurogenesis and functional recovery after spinal cord contusion injury in adult rats. *Journal of neuroscience research*. 6. 925–933.
- Ohta, M.; Suzuki, Y.; Noda, T.; Ejiri, Y.; Dezawa, M.; Kataoka, K. (2004) Bone marrow stromal cells infused into the cerebrospinal fluid promote functional recovery of the injured rat spinal cord with reduced cavity formation. *Experimental neurology*. 2. 266–278.
- Okabe, S.; Forsberg-Nilsson, K.; Spiro, A.; Segal, M.; McKay, R. (1996) Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. *Mechanisms of development*. 1. 89–102.
- Okubo, T.; Hayashi, D.; Yaguchi, T.; Fujita, Y.; Sakaue, M.; Suzuki, T. (2016) Differentiation of rat adipose tissue-derived stem cells into neuron-like cells by valproic acid, a histone deacetylase inhibitor. *Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science*. 1. 45–51.
- Oppenheim, R. (1991) Cell death during development of the nervous system. *Annual review of neuroscience*. 14: 453–501.
- Paepe, C. de; Krivega, M.; Cauffman, G.; Geens, M.; van de Velde, H. (2014) Totipotency and lineage segregation in the human embryo. *Molecular human reproduction*. 7. 599–618.
- Peister, A.; Mellad, J.; Larson, B.; Hall, B.; Gibson, L.; Prockop, D. (2004) Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood*. 5. 1662–1668.
- Pencea, V.; Bingaman, K.; Freedman, L.; Luskin, M. (2001) Neurogenesis in the subventricular zone and rostral migratory stream of the neonatal and adult primate forebrain. *Experimental neurology*. 1. 1–16.
- Pittenger, M.; Mackay, A.; Beck, S.; Jaiswal, R.; Douglas, R.; Mosca, J.; Moorman, M.; Simonetti, D.; Craig, S.; Marshak, D. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (New York, N.Y.)* 5411. 143–147.
- Pla, P.; Moore, R.; Morali, O.; Grille, S.; Martinozzi, S.; Delmas, V.; Larue, L. (2001) Cadherins in neural crest cell development and transformation. *Journal of cellular physiology*. 2. 121–132.
- Potten, C.; Loeffler, M. (1990) Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development (Cambridge, England)*. 4. 1001–1020.

- Puro, D.; Agardh, E. (1984) Insulin-mediated regulation of neuronal maturation. *Science (New York, N.Y.)*. 4667. 1170–1172.
- Rao, M. (1999) Multipotent and restricted precursors in the central nervous system. *The Anatomical record*. 4. 137–148.
- Rao, M.; Mayer-Proschel, M. (1997) Glial-restricted precursors are derived from multipotent neuroepithelial stem cells. *Developmental biology*. 1. 48–63.
- Rastegar, F.; Shenaq, D.; Huang, J.; Zhang, W.; Zhang, B.-Q.; He, B.-C.; Chen, L. (2010) Mesenchymal stem cells: Molecular characteristics and clinical applications. *World journal of stem cells*. 4. 67–80.
- Rauskolb, S.; Zagrebelsky, M.; Dreznjak, A.; Deogracias, R.; Matsumoto, T.; Wiese, S. (2010) Global deprivation of brain-derived neurotrophic factor in the CNS reveals an area-specific requirement for dendritic growth. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 5. 1739–1749.
- Reh, T. (2002) Neural stem cells: form and function. *Nature neuroscience*. 5. 392–394.
- Reich, C. Charakterisierung des Wachstums- und Differenzierungspotentials caniner mesenchymaler Stammzellen aus Knochenmark und Fettgewebe. Dissertation. Justus-Liebig-Universität Gießen. 2010.
- Reich, C.; Raabe, O.; Wenisch, S.; Bridger, P.; Kramer, M.; Arnhold, S. (2012) Isolation, culture and chondrogenic differentiation of canine adipose tissue- and bone marrow-derived mesenchymal stem cells--a comparative study. *Veterinary research communications*. 2. 139–148.
- Reichardt, L. (2006) Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. 1473. 1545–1564.
- Reynolds, B.; Weiss, S. (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science (New York, N.Y.)*. 5052. 1707–1710.
- Roura, S.; Farre, J.; Soler-Botija, C.; Llach, A.; Hove-Madsen, L.; Cairo, J.; Godia, F.; Cinca, J.; Bayes-Genis, A. (2006) Effect of aging on the pluripotential capacity of human CD105+ mesenchymal stem cells. *European journal of heart failure*. 6. 555–563.
- Ryu, H.; Lim, J.; Byeon, Y.; Park, J.; Seo, M.; Lee, Y. (2009) Functional recovery and neural differentiation after transplantation of allogenic adipose-derived stem cells in a canine model of acute spinal cord injury. *Journal of veterinary science*. 4. 273–84.
- Safford, K.; Safford, S.; Gimble, J.; Shetty, A.; Rice, H. (2004) Characterization of neuronal/glial differentiation of murine adipose-derived adult stromal cells. *Experimental neurology*. 2. 319–328.
- Safford, K.; Hicok, K.; Safford, S.; Halvorsen, Y.-D.; Wilkison, W.; Gimble, J.; Rice, H. (2002) Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2. 371–379.
- Sanchez-Ramos, J.; Song, S.; Cardozo-Pelaez, F.; Hazzi, C.; Stedeford, T.; Willing, A. (2000) Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Experimental neurology*. 2. 247–256.
- Sanchez-Ramos, J. (2002) Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood. *Journal of neuroscience research*. 6. 880–893.
- Sanes, J.; Lichtman, J. (1999) Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annual review of neuroscience*. 22. 389–442.
- Scharfman, H.; Goodman, J.; Macleod, A.; Phani, S.; Antonelli, C.; Croll, S. (2005) Increased neurogenesis and the ectopic granule cells after intrahippocampal BDNF infusion in adult rats. *Experimental neurology*. 2. 348–356.

- Schmechel, D.; Brightman, M.; Marangos, P. (1980) Neurons switch from non-neuronal enolase to neuron-specific enolase during differentiation. *Brain research*. 1. 195–214.
- Schubert, M.; Gautam, D.; Surjo, D.; Ueki, K.; Baudler, S.; Schubert, D. (2004) Role for neuronal insulin resistance in neurodegenerative diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 9. 3100–3105.
- Seamon, K.; Daly, J. (1981) Forskolin: a unique diterpene activator of cyclic AMP-generating systems. *Journal of cyclic nucleotide research*. 4. 201–224.
- Sekiya, I.; Colter, D.; Prockop, D. (2001) BMP-6 enhances chondrogenesis in a subpopulation of human marrow stromal cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2. 411–418.
- Sharan, K.; Siddiqui, J.; Swarnkar, G.; Chattopadhyay, N. (2008) Role of calcium-sensing receptor in bone biology. *The Indian journal of medical research*. 3. 274–286.
- Shetty, A.; Turner, D. (1998) In vitro survival and differentiation of neurons derived from epidermal growth factor-responsive postnatal hippocampal stem cells: inducing effects of brain-derived neurotrophic factor. *Journal of neurobiology*. 4. 395–425.
- Shiomura, Y.; Hirokawa, N. (1987) Colocalization of microtubule-associated protein 1A and microtubule-associated protein 2 on neuronal microtubules in situ revealed with double-label immunoelectron microscopy. *The Journal of cell biology*. 6. 1575–1578.
- Song, H.-j.; Stevens, C.; Gage, F. (2002) Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons. *Nature neuroscience*. 5. 438–445.
- Stamm, C.; Westphal, B.; Kleine, H.-D.; Petzsch, M.; Kittner, C.; Klinge, H. (2003) Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet (London, England)*. 9351. 45–46.
- Studer, L.; Tabar, V.; McKay, R. (1998) Transplantation of expanded mesencephalic precursors leads to recovery in parkinsonian rats. *Nature neuroscience*. 4. 290–295.
- Svendsen, C.; Bhattacharyya, A.; Tai, Y. (2001) Neurons from stem cells: preventing an identity crisis. *Nature reviews*. 11. 831–834.
- Svendsen, C.; Clarke, D.; Rosser, A.; Dunnett, S. (1996) Survival and differentiation of rat and human epidermal growth factor-responsive precursor cells following grafting into the lesioned adult central nervous system. *Experimental neurology*. 2. 376–388.
- Sykova, E.; Jendelova, P. (2007) Migration, fate and in vivo imaging of adult stem cells in the CNS. *Cell death and differentiation*. 7. 1336–1342.
- Takemitsu, H.; Zhao, D.; Yamamoto, I.; Harada, Y.; Michishita, M.; Arai, T. (2012) Comparison of bone marrow and adipose tissue-derived canine mesenchymal stem cells. *BMC Veterinary Research*. 8:150.
- Tanabe, Y.; Jessell, T. (1996) Diversity and pattern in the developing spinal cord. *Science (New York, N.Y.)*. 5290. 1115–1123.
- Tanaka, M.; Sawada, M.; Yoshida, S.; Hanaoka, F.; Marunouchi, T. (1995) Insulin prevents apoptosis of external granular layer neurons in rat cerebellar slice cultures. *Neuroscience letters*. 1. 37–40.
- Theman, T.; Collins, M. (2009) The role of the calcium-sensing receptor in bone biology and pathophysiology. *Current pharmaceutical biotechnology*. 3. 289–301.
- Theurkauf, W.; Vallee, R. (1982) Molecular characterization of the cAMP-dependent protein kinase bound to microtubule-associated protein 2. *The Journal of biological chemistry*. 6. 3284–3290.
- Tomac, A.; Lindqvist, E.; Lin, L.; Ogren, S.; Young, D.; Hoffer, B.; Olson, L. (1995) Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF in vivo. *Nature*. 6512. 335–339.

- Torres, F.; Rodrigues, C.; Stocchero, I.; Ferreira, M. (2007) Stem cells from the fat tissue of rabbits: an easy-to-find experimental source. *Aesthetic plastic surgery*. 5. 574–578.
- Tropepe, V.; Coles, B.; Chiasson, B.; Horsford, D.; Elia, A.; McInnes, R. (2000) Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science (New York, N.Y.)*. 5460. 2032–2036.
- Tropepe, V.; Sibilio, M.; Ciruna, B.; Rossant, J.; Wagner, E.; van der Kooy, D. (1999) Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon. *Developmental biology*. 1. 166–188.
- Trupp, M.; Ryden, M.; Jornvall, H.; Funakoshi, H.; Timmusk, T.; Arenas, E.; Ibanez, C. (1995) Peripheral expression and biological activities of GDNF, a new neurotrophic factor for avian and mammalian peripheral neurons. *The Journal of cell biology*. 1. 137–148.
- Tryankowski, E.; Reich, C.; Raabe, O.; Wensch, S.; Arnhold, S. Effect of varying  $\text{Ca}^{2+}$ -concentrations on the osteogenic differentiation of adult mesenchymal stem cells. Abstract. 27. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft. 2010. Würzburg. [http://www.anatomische-gesellschaft.de/images/abstract\\_workshop/27\\_tagung.pdf](http://www.anatomische-gesellschaft.de/images/abstract_workshop/27_tagung.pdf).
- Uccelli, A.; Moretta, L.; Pistoia, V. (2008) Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature reviews. Immunology*. 9. 726–736.
- Vallee, R.; DiBartolomeis, M.; Theurkauf, W. (1981) A protein kinase bound to the projection portion of MAP 2 (microtubule-associated protein 2). *The Journal of cell biology*. 3. 568–576.
- Vescovi, A.; Galli, R.; Gritti, A. (2001) The neural stem cells and their transdifferentiation capacity. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 4. 201–205.
- Vicario-Abejon, C.; Collin, C.; McKay, R.; Segal, M. (1998) Neurotrophins induce formation of functional excitatory and inhibitory synapses between cultured hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 18. 7256–7271.
- Vicario-Abejon, C.; Owens, D.; McKay, R.; Segal, M. (2002) Role of neurotrophins in central synapse formation and stabilization. *Nature reviews. Neuroscience*. 12. 965–974.
- Vidal, M.; Kilroy, G.; Lopez, M.; Johnson, J.; Moore, R.; Gimble, J. (2007) Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Veterinary surgery*. 7. 613–622.
- Vieira, N.; Brandalise, V.; Zucconi, E.; Secco, M.; Strauss, B.; Zatz, M. (2010) Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. *Cell Transplantation*. 3. 279–289.
- Vogel, W.; Grunebach, F.; Messam, C.; Kanz, L.; Brugger, W.; Bühring, H.-J. (2003) Heterogeneity among human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and neural progenitor cells. *Haematologica*. 2. 126–133.
- Volk, S.; Diefenderfer, D.; Christopher, S.; Haskins, M.; Leboy, P. (2005) Effects of osteogenic inducers on cultures of canine mesenchymal stem cells. *American journal of veterinary research*. 10. 1729–1737.
- Volk, S.; Wang, Y.; Hankenson, K. (2012) Effects of donor characteristics and ex vivo expansion on canine mesenchymal stem cell properties: implications for MSC-based therapies. *Cell transplantation*. 10. 2189–2200.
- Wang, L.-P.; Kempermann, G.; Kettenmann, H. (2005) A subpopulation of precursor cells in the mouse dentate gyrus receives synaptic GABAergic input. *Molecular and cellular neurosciences*. 2. 181–189.
- Wang, W.-m.; Ding, Y. (2013) Butyl hydroxyanisole and  $\beta$ -mercaptoethanol promote human umbilical cord mesenchymal stem cells differentiate into neural cell. *Journal of Southeast University (Medical Science Edition)*. 02.



- Weiner, L. (2008) Definitions and criteria for stem cells. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. 438. 3–8.
- Weingarten, M.; Lockwood, A.; Hwo, S.; Kirschner, M. (1975) A protein factor essential for microtubule assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 5. 1858–1862.
- Weissman, I. (2000) Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*. 1. 157–168.
- Wenisch, S.; Trinkaus, K.; Hild, A.; Hose, D.; Heiss, C.; Alt, V.; Klisch, C.; Meissl, H.; Schnettler, R. (2006) Immunochemical, ultrastructural and electrophysiological investigations of bone-derived stem cells in the course of neuronal differentiation. *Bone*. 6. 911–921.
- Wenisch, S.; Trinkaus, K.; Hild, A.; Hose, D.; Herde, K.; Heiss, C.; Kilian, O.; Alt, V.; Schnettler, R. (2005) Human reaming debris: a source of multipotent stem cells. *Bone*. 1. 74–83.
- Wiese, C.; Rolletschek, A.; Kania, G.; Blyszczuk, P.; Tarasov, K.; Tarasova, Y.; Wersto, R.; Boheler, K.; Wobus, A. (2004) Nestin expression--a property of multi-lineage progenitor cells? *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 19-20. 2510–2522.
- Williams, S.; Wang, T.; Castrillo, R.; Jarrell, B. (1994) Liposuction-derived human fat used for vascular graft sodding contains endothelial cells and not mesothelial cells as the major cell type. *Journal of vascular surgery*. 5. 916–923.
- Wislet-Gendebien, S.; Hans, G.; Leprince, P.; Rigo, J.-M.; Moonen, G.; Rogister, B. (2005) Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: switch from nestin-positive to excitable neuron-like phenotype. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 3. 392–402.
- Wislet-Gendebien, S.; Wautier, F.; Leprince, P.; Rogister, B. (2005) Astrocytic and neuronal fate of mesenchymal stem cells expressing nestin. *Brain research bulletin*. 1-2. 95–102.
- Woodbury, D.; Schwarz, E.; Prockop, D.; Black, I. (2000) Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *Journal of neuroscience research*. 4. 364–370.
- Woodbury, D.; Reynolds, K.; Black, I. (2002) Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. *Journal of neuroscience research*. 6. 908–917.
- Wu, S.; Suzuki, Y.; Ejiri, Y.; Noda, T.; Bai, H.; Kitada, M.; Kataoka, K.; Ohta, M.; Chou, H.; Ide, C. (2003) Bone marrow stromal cells enhance differentiation of cocultured neurosphere cells and promote regeneration of injured spinal cord. *Journal of neuroscience research*. 3. 343–351.
- Yaghoobi, M.; Mahani, M. (2008) NGF and BDNF expression drop off in neurally differentiated bone marrow stromal stem cells. *Brain research*. 1203. 26–31.
- Yaghoobi, M.; Mowla, S. (2006) Differential gene expression pattern of neurotrophins and their receptors during neuronal differentiation of rat bone marrow stromal cells. *Neuroscience letters*. 1-2. 149–154.
- Young, C.; Jarrell, B.; Hoying, J.; Williams, S. (1992) A porcine model for adipose tissue-derived endothelial cell transplantation. *Cell Transplantation*. 4. 293–298.
- Zhang, H.-T.; Liu, Z.-L.; Yao, X.-Q.; Yang, Z.-J.; Xu, R.-X. (2012) Neural differentiation ability of mesenchymal stromal cells from bone marrow and adipose tissue: a comparative study. *Cytotherapy*. 10. 1203–1214.
- Zhang, X.-m.; Zhang, B.-d.; Guo, T.-Y.; Yan, X.-f.; Chen, Y.-j.; Lei, L.; Jin, L.-h. (2012) Beta hydroxy acid and  $\beta$ -mercaptoethanol promote differentiation of epigenetic modified NIH/3T3 fibroblasts into neural stem cell-like cell. *Progress of Anatomical Sciences*. 01.
- Zhao, M.; Momma, S.; Delfani, K.; Carlen, M.; Cassidy, R.; Johansson, C.; Brismar, H.; Shupliakov, O.; Frisen, J.; Janson, A. (2003) Evidence for neurogenesis in the adult

mammalian substantia nigra. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 13. 7925–7930.

Zhao, Y.; Waldman, S.; Flynn, L. (2012) The effect of serial passaging on the proliferation and differentiation of bovine adipose-derived stem cells. *Cells, tissues, organs*. 5. 414–427.

Zheng, H.; Martin, J.; Duwayri, Y.; Falcon, G.; Buckwalter, J. (2007) Impact of aging on rat bone marrow-derived stem cell chondrogenesis. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*. 2. 136–148.

Zuk, P.; Zhu, M.; Mizuno, H.; Huang, J.; Futrell, J.; Katz, A.; Benhaim, P.; Lorenz, H.; Hedrick, M. (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue engineering*. 2. 211–228.

Zuk, P.; Zhu, M.; Ashjian, P.; Ugarte, D. de; Huang, J.; Mizuno, H.; Alfonso, Z.; Fraser, J.; Benhaim, P.; Hedrick, M. (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular biology of the cell*. 12. 4279–4295.

Zurn, A.; Baetge, E.; Hammang, J.; Tan, S.; Aebischer, P. (1994) Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), a new neurotrophic factor for motoneurons. *Neuroreport*. 1. 113–118.



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6503-4



9 17 8 3 8 3 5 19 6 5 0 3 4 11

Photo cover: © CallallooFred @ Fotolia.de